

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Bc. Jitka Máchalová

STUDIUM NUCENÉ DEGRADACE CANAGLIFLOZINU S VYUŽITÍM HPLC

Forced degradation study of canagliflozin with the use of HPLC

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Tomáš Křížek, Ph.D.

Praha 2020

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 27. května 2020

Abstrakt

Tato práce se zabývá vývojem a optimalizací metody pro stanovení canagliflozinu pomocí HPLC s UV a MS detekcí. Vyvinutá metoda byla následně použita pro studium nucené degradace této sloučeniny a zkoumání hlavních degradačních produktů vzniklých vystavením canagliflozinu oxidativnímu stresu. Canagliflozin je derivát fenolického glykosidu a inhibitor glukoso-sodného transportéru 2, který stimuluje močovou exkreci glukózy potlačením reabsorpce glukózy z proximálního tubulu v ledvinách. Canagliflozin se používá k řízení hladiny glukózy v krvi u pacientů s diabetem mellitu typu 2. V optimalizované metodě byla použita kolona Agilent Poroshell 120 SB-Aq ($2,1 \times 100$ mm, $2,7 \mu\text{m}$) a jako mobilní fáze byla použita směs pufru (10mM HCOOH upravená hydroxidem amonným na pH 3,5) a acetonitrilu. Součástí validace metody bylo testování přesnosti, opakovatelnosti, meze detekce a kvantifikace, linearity a lineárního dynamického rozsahu, robustnosti metody a testování stability vzorku. Mez detekce metody byla $8,9 \cdot 10^{-5} \text{ mg ml}^{-1}$ ($2,0 \cdot 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$) a mez kvantifikace byla $3,0 \cdot 10^{-4} \text{ mg ml}^{-1}$ ($6,8 \cdot 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$). Pro koncentraci $0,3 \text{ mg ml}^{-1}$ byla opakovatelnost ($n = 7$) retenčního času, vyjádřená jako relativní směrodatná odchylka, 0,17 % a plochy píku 0,75 %. Pro koncentraci $5 \cdot 10^{-3} \text{ mg ml}^{-1}$ byla opakovatelnost retenčního času 0,18 % a plochy píku 1,58 %. Koeficient linearity kalibrační závislosti odpovídal hodnotě 0,9517, koeficient determinace byl 0,9997 a lineární dynamický rozsah metody byl $3,0 \cdot 10^{-4} - 0,5 \text{ mg ml}^{-1}$. Vyvinutá metoda byla použita ke studiu nucené degradace canagliflozinu. V rámci studie byla účinná látka podrobena chemické oxidaci (vystavením 3% H_2O_2) při 50°C po dobu 1 - 3 dnů a zároveň byla testována rychlost degradace při laboratorní teplotě po dobu 4 – 7 dní. Na základě výsledků bylo zjištěno, že na rychlost degradace má vliv obsah vody a methanolu v rozpouštědle vzorku a dále kyselost prostředí. Vzniklé degradační produkty byly dále zkoumány pomocí MS. Vlivem oxidativního stresu došlo k navázání dvou atomů kyslíku na molekulu canagliflozinu. V přítomnosti kyseliny chlorovodíkové byla molekula canagliflozinu obohacena o atom chloru a došlo tak ke vzniku nežádoucího nereálného oxidačního produktu. Proto pro testování vlivu kyselého prostředí na rychlost chemické oxidace byla vhodnější H_2SO_4 . Degradace za laboratorní teploty probíhala výrazně pomaleji než při 50°C a vznikaly při ní stejné degradační produkty jako při experimentech za zvýšené teploty. Stejně jako během testování při zvýšené teplotě, vyšší množství degradačních produktů vznikalo v prostředí s vyšším obsahem vody, a naopak

nižší množství degradačních produktů se nacházelo v prostředí s methanolem jako organickým modifikátorem.

Klíčová slova

Canagliflozin, chemická oxidace, nucená degradace, HPLC, testování stability

Abstract

In this work a method for determination of canagliflozin and its degradation products by HPLC with UV and MS detector was developed. The developed method was used to study the forced degradation of canagliflozin and to investigate the major degradation products resulting from exposure of canagliflozin to oxidative stress. Canagliflozin is a phenolic glycoside derivative and a glucose-sodium transporter 2 inhibitor that stimulates urinary glucose excretion by suppressing glucose reabsorption from the proximal tubule in the kidneys. Canagliflozin is used to control blood glucose levels in patients with type 2 diabetes. In an optimized method, an Agilent Poroshell 120 SB-Aq (2.1×100 mm, $2.7 \mu\text{m}$) column was used and a mixture of buffer (10mM HCOOH adjusted with ammonium hydroxide to pH 3.5) and acetonitrile as a mobile phase. The method validation included testing of accuracy, repeatability, the limit of detection and quantification, linearity and linear dynamic range, the robustness of the method, and testing of sample stability. The limit of detection of the method was $8.9 \cdot 10^{-5} \text{ mg ml}^{-1}$ ($2.0 \cdot 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$) and the limit of quantification was $3.0 \cdot 10^{-4} \text{ mg ml}^{-1}$ ($6.8 \cdot 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$). At a concentration of 0.3 mg ml^{-1} , the repeatability ($n = 7$) was 0.17 % and 0.75 % for the retention time and the peak area, respectively. At a concentration of $5 \cdot 10^{-3} \text{ mg ml}^{-1}$, the repeatability was 0.18 % and 1.58 %. The linearity coefficient of the calibration dependence was 0.9517, the determination coefficient was 0.9997 and the linear dynamic range of the method was $3.0 \cdot 10^{-4} - 0.5 \text{ mg ml}^{-1}$. The developed method was used for the forced degradation study of canagliflozin. For the study, the drug was subjected to chemical oxidation (3% H_2O_2) at 50°C for 1–3 days and at room temperature for 4 – 7 days. Based on the results, it was found that the rate of degradation is affected by the water content in the sample solvent and pH. The main degradation products were studied by MS. Due to oxidative stress, two oxygen atoms were bound to the molecule of canagliflozin. In the presence of hydrochloric acid, a chlorine atom was bound to the molecule of canagliflozin and formed thus an undesired unrealistic oxidation product. Therefore, H_2SO_4 was more suitable for testing the effect of acidic environment on the chemical oxidation rate. Degradation at room temperature was significantly slower than at 50°C . A higher amount of degradation products was produced in the environment with higher water content, while a lower content of degradation products was found with methanol used as an organic modifier.

Keywords

Canagliflozin, chemical oxidation, forced degradation study, HPLC, stability testing

Poděkování

Ráda bych poděkovala svému vedoucímu diplomové práce RNDr. Tomáši Křížkovi, PhD. především za jeho cenné rady a odbornou pomoc při řešení dané problematiky a za velkou míru trpělivosti, kterou mi věnoval při vypracování této práce. Dále bych chtěla poděkovat své rodině za veškerou podporu, kterou mi během studia poskytla.

OBSAH

1	TEORETICKÝ ÚVOD	- 12 -
1.1	Cíl diplomové práce	- 12 -
1.2	Canagliflozin a Invokana	- 12 -
1.3	Degradační studie léčiv	- 13 -
1.3.1	Testované podmínky během zátěžových studií léčiv	- 15 -
1.4	Využití vysokoúčinné kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie ve farmaceutické analýze	- 18 -
1.5	Metody stanovení canagliflozinu	- 19 -
1.6	Zátěžové degradační studie canagliflozinu	- 21 -
2	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	- 24 -
2.1	Použité chemikálie a přístroje	- 24 -
2.1.1	Chemikálie	- 24 -
2.1.2	Instrumentace	- 25 -
2.2	Příprava vzorků a kalibračních roztoků	- 25 -
2.2.1	Příprava vzorků pro testování rozpustnosti	- 25 -
2.2.2	Příprava kalibračních roztoků	- 25 -
2.2.3	Příprava roztoků pro vlastní měření	- 26 -
2.3	Chromatografické podmínky	- 28 -
2.4	Analytické zpracování dat	- 29 -
2.4.1	Mez detekce a kvantifikace	- 29 -
2.4.2	Linearita a lineární dynamický rozsah	- 29 -
2.4.3	Opakovatelnost	- 30 -
2.4.4	Výtěžnost (pravdivost) metody	- 30 -
2.4.5	Přenos vzorku mezi měřeními	- 30 -
3	VÝSLEDKY A DISKUZE	- 31 -
3.1	Vývoj analytické metody	- 31 -
3.1.1	Rozpustnost účinné látky	- 31 -
3.1.2	Volba optimálního gradientového programu	- 31 -
3.1.3	Porovnání vyvinuté metody s metodami v literární rešerši	- 35 -
3.2	Validace metody	- 36 -
3.2.1	Kalibrační závislost	- 36 -
3.2.2	Vyhodnocení analytických parametrů	- 37 -
3.2.3	Robustnost	- 39 -
3.2.4	Stabilita v rozpouštědle vzorku	- 41 -

3.3	Zátěžová degradační studie canagliflozinu	- 42 -
3.3.1	Nárůst obsahu degradačních produktů v čase	- 42 -
3.3.2	Vliv kyselého a zásaditého prostředí v rozpouštědle vzorku	- 44 -
3.3.3	Degradace za laboratorní teploty	- 46 -
3.4	Studium degradačních produktů pomocí MS	- 48 -
4	ZÁVĚR	- 54 -
5	POUŽITÁ LITERATURA	- 55 -
6	PŘÍLOHY	- 58 -

Seznam použitých zkratk a symbolů

Ac-Di-Sol	sodná sůl kroskarmelózy
API	léčivá látka přípravku (z anglického <i>active pharmaceutical ingredient</i>)
AU	volitelná jednotka (z anglického <i>arbitrary unit</i>)
DAD	detektor s diodovým polem (z anglického <i>diode array detector</i>)
ICH	Mezinárodní konference o harmonizaci technických požadavků na registraci léčivých přípravků pro humánní použití (z anglického <i>International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use</i>)
IMP	nečistota, degradační produkt (z anglického <i>impurity</i>)
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (z anglického <i>high performance liquid chromatography</i>)
LC-MS	kapalinová chromatografie s hmotnostním detektorem (z anglického <i>liquid chromatography-mass spectrometry</i>)
LC-MS/MS	kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií (z anglického <i>liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry</i>)
LOD	mez detekce (z anglického <i>limit of detection</i>)
LOQ	mez kvantifikace (z anglického <i>limit of quantification</i>)
MS	hmotnostní spektrometr (z anglického <i>mass spectrometer</i>)
MRM	mnohonásobné sledování přechodových reakcí (z anglického <i>multiple reaction monitoring</i>)
RP-HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie převrácených fází (z anglického <i>reverse phase HPLC</i>)
RRT	Relativní retenční čas (z anglického <i>relative retention time</i>)
UHPLC	ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie (z anglického <i>ultra-high performance liquid chromatography</i>)
UV	ultrafialové záření (z anglického <i>ultraviolet</i>)

Použité symboly

A	plocha píku
σ	průměrná amplituda šumu
ϕ_A	objemové zastoupení vodné složky A v mobilní fázi
ϕ_B	objemové zastoupení organické složky B v mobilní fázi
a	směrnice kalibrační přímky
s	směrodatná odchylka měření
\bar{x}	aritmetický průměr hodnot signálů při n měřeních
s_r	relativní směrodatná odchylka
x_i	prvek ze statistického souboru o indexu i
m/z	poměr hmotnosti k náboji iontu
n	počet měření
t	čas
t_r	retenční čas
T	teplota

1 TEORETICKÝ ÚVOD

1.1 Cíl diplomové práce

Cílem této diplomové práce bylo vyvinutí analytické metody HPLC tak, aby canagliflozin mohl být stanoven s použitím UV i MS detektoru a vyvinutá metoda pak mohla být použita pro studium nucené degradace této sloučeniny a zkoumání hlavních degradačních produktů vzniklých vystavením canagliflozinu oxidativnímu stresu.

1.2 Canagliflozin a Invokana

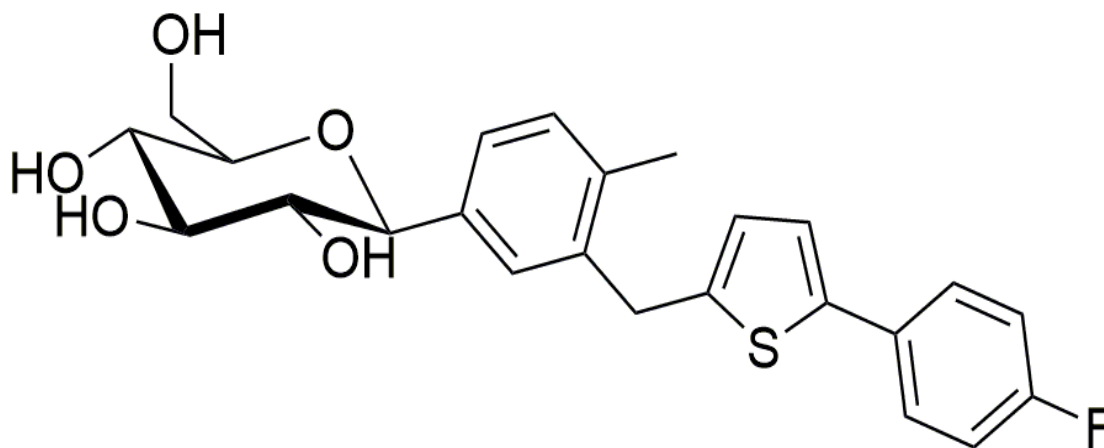
Canagliflozin (struktura znázorněna na Obr. 1.1) je derivát fenolického glykosidu s molární hmotností $444,52 \text{ g mol}^{-1}$, jehož empirický vzorec je $\text{C}_{24}\text{H}_{25}\text{FO}_5\text{S}$. Canagliflozin je bílý prášek, prakticky nerozpustný ve vodném prostředí v rozmezí pH 1,1 – 12,9 [1]. Hodnota pK_a podle zdroje ChemAxon je 12,57 [2]. Canagliflozin obsahuje celkově 5 stereoizomerních center a vyskytuje se ve dvou formách: jako hemihydrát nebo jako amorfní [3].

Canagliflozin se řadí mezi inhibitory sodno-glukózového kotransportéru 2, který se nachází v proximálních tubulech ledvin a jeho funkcí je reabsorpce filtrované glukózy z renálního tubulárního lumenu. Inhibicí tohoto transportéru dochází k potlačení reabsorpce filtrované glukózy a ke snížení renálního prahu pro glukózu. Výsledkem této inhibice je tak stimulace močové exkrece glukózy [1].

Konečným výsledkem působení canagliflozinu je tedy zvýšené vylučování glukózy, menší absorpce glukózy ledvinami a snížení koncentrace glukózy v krvi, což vede k lepší kontrole glykemie a snížení rizika vzniku kardiovaskulárních příhod u pacientů s diabetem mellitu typu 2 [1].

Canagliflozin je oficiálně zavedený v americkém lékopisu [4]. Invokana je název léčivého přípravku, vyráběného společností Janssen Research & Development, USA, který obsahuje účinnou farmaceutickou látku (API, z angl. *active pharmaceutical ingredient*) canagliflozin. Léčivo se používá ke zlepšení kontroly glykemie u dospělých pacientů, kteří trpí diabetem mellitu typu 2 [5]. Zároveň se používá pro snížení rizika vzniku nežádoucích kardiovaskulárních příhod u dospělých pacientů s diabetem mellitu typu 2 a s prokázaným kardiovaskulárním onemocněním [6]. Doporučená dávka je

100 mg canagliflozinu jednou denně. Jedna tableta obsahuje 100 mg API canagliflozinu. Vyrábějí se však i 300mg tablety, které se používají u pacientů, kteří tolerují dávku 100 mg, mají zvýšenou glomerulární filtraci či clearance a je u nich potřeba přísnější kontrola hladiny glukózy [7].



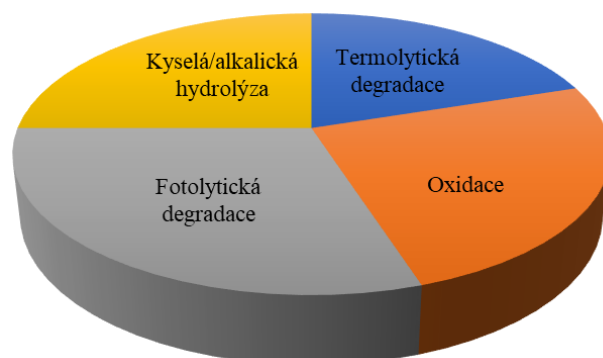
Obr. 1.1: Molekula canagliflozinu. Struktura vytvořena v Chemdraw.

1.3 Degradací studie léčiv

Zátěžové testování (degradací studie) je považováno za důležitou součást procesu vývoje léčiv, která vede k objasnění vnitřní stability účinné látky. Degradacími studiemi lze identifikovat pravděpodobné degradací produkty a odhalit hlavní degradací cesty účinné látky. Objasnění vnitřní stability molekuly poskytuje základ pro vývoj a validaci analytických metod a pro vývoj stabilních formulací (konečnou podobu léčivého přípravku) [8].

Farmaceutický průmysl se snaží o snížení času a nákladů, které jsou zapotřebí k uvedení výrobků na trh, proto se věnuje velké úsilí vývoji nových metod, které vedou k zefektivnění degradací studií, včasnému identifikování potenciálních problémů se stabilitou a jsou tak důležité pro vývoj nových bezpečných léků. Povaha zátěžového testování závisí na účinné látce jako takové a na typu výsledného léčivého produktu, mělo by se však provádět na jedné šarži léčiva a zahrnovat účinky teploty, vlhkosti, oxidace a fotolýzy (viz Obr. 1.2). Testování by mělo také zahrnout citlivost účinné látky na kyselou a alkalickou hydrolýzu v širokém rozsahu hodnot pH [8]. Účelem stabilitních zkoušek je tedy prokázat, jak se mění kvalita účinné látky nebo léčivého přípravku

s časem vlivem různých faktorů (teplota, vlhkost...), doporučit podmínky uchovávání, dobu reatestace pro účinnou látku a dobu použitelnosti pro konečný léčivý přípravek [9]. Účinná látka je považována za stabilní, jestliže vyhovuje specifikaci za podmínek uchovávání při 25 °C a 60% relativní vlhkosti (RV) po dobu 2 let a za podmínek uchovávání 40 °C a 75% RV po dobu 6 měsíců [9].



Obr. 1.2: Během procesu vývoje léčiv by se měly pro navrhování konečné podoby účinné látky a formulovaného léčivého přípravku hodnotit čtyři farmaceuticky relevantní degradační mechanismy: termolytické, hydrolytické, oxidační a fotolytické.

Zátěžové testování je ve své podstatě prediktivní a poskytuje tak vědecký základ pro vývoj metod zajišťujících stabilitu. Degradační produkty vznikající během vystavení léku zátěžovým podmínkám mohou nebo nemusí být relevantní pro skutečné podmínky skladování účinné látky nebo léčivého přípravku [10]. To se odráží na definici zátěžového testování podle Mezinárodní konference o harmonizaci technických požadavků na registraci léčivých přípravků pro humánní použití (ICH): Zkoumání degradačních produktů za zátěžových podmínek je užitečné při stanovení degradačních cest a vývoji a validaci vhodných analytických metod. Takové zkoumání však nemusí být nezbytné pro určité produkty rozkladu, pokud bylo prokázáno, že nejsou vytvářeny za podmínek zrychleného nebo dlouhodobého testování [11].

Zrychlené stabilitní zkoušky jsou prováděny za extrémních skladovacích podmínek a trvají 6 měsíců. Účelem je urychlení chemického rozkladu nebo fyzikální změny účinné látky nebo léčivého přípravku. Umožňují určit předběžný čas použitelnosti a prozatímní skladovací dobu ještě před ukončením dlouhodobých testů stability. Dlouhodobé testy stability trvají 12 měsíců a poskytují tak nejobjektivnější údaje o stabilitě léčiv a léčivých přípravků. Testované vzorky se testují v podmínkách, které

odpovídají reálným podmínkám v určitém klimatickém pásmu, kde bude příslušný lék registrován a distribuován.

Kromě dlouhodobých a zrychlených testů stability existují ještě studie nucené degradace, které trvají podstatně kratší dobu, řádově několik týdnů. Stabilita léčiv nucenou degradací se testuje ještě za extrémnějších podmínek než při zrychlených studiích. Výsledky vzniklé studiemi nucené degradace slouží jako základ pro předpověď degradačních produktů pro stabilitní a zrychlené studie, pro objasnění vnitřní stability API léčiva a pro možnost odhalení degradačních mechanismů [12].

1.3.1 Testované podmínky během zátěžových studií léčiv

1.3.1.1 Hydrolýza

Hydrolytické reakce jsou katalyzovány kyselinou nebo zásadou. Testování hydrolýzy je důležité ve všech protonačních stavech, ve kterých se daná sloučenina může nacházet. Obsahuje-li molekula více funkčních skupin, které se mohou při určitém pH ionizovat, je důležité testovat hydrolytické působení v daném rozsahu hodnot pH. Obvyklým přístupem je testování hydrolýzy v širokém rozsahu pH po definovaných přírůstcích (např. 1 jednotka pH). Řada farmaceutických společností používá rozsah testovaných hodnot pH od 1 (např. 0,1M HCl) do 13 (např. 0,1M NaOH) [13]. Je možné použít i hodnoty pH menší než 1 a vyšší než 13. Takto kyselé nebo bazické podmínky urychlují hydrolýzu a používají se během zrychlených studií. V takovýchto podmínkách je však riziko tvorby nereálných degradačních produktů. Proto pro zrychlené testování je vhodnější testovat hodnoty pH v rozsahu 1–13 se současně zvýšenou teplotou s horní hranicí 70 °C [14].

Při navrhování hydrolytických testů je problémem rozpustnost dané sloučeniny. Řada nízkomolekulárních léčiv se vyznačuje velmi malou rozpustností ve vodě. Pro zkoumání hydrolytické stability tak musí být použita buď suspenze, nebo se do vzorku přidává pomocné rozpouštědlo mísitelné s vodou (nejčastějšími pomocnými rozpouštědly jsou methanol a acetonitril). Methanol se však často účastní degradačních pochodů (např. může působit jako nukleofil při reakci s elektrofilními místy), obzvláště v kyselém prostředí. Proto se používá především acetonitril, který je obecně považovaný za inertní rozpouštědlo. V určitých případech se však acetonitril může také zapojovat do reakcí,

kteře vedou ke vzniku nereálných degračních produktů (např. acetonitril přispívá k epoxidačním reakcím katalyzovaným bázemi v přítomnosti peroxidů) [15]. Dále za zvýšené teploty v přítomnosti kyseliny nebo báze se acetonitril může rozkládat na acetamid nebo kyselinu octovou, což se projeví jako časně eluující pík při vysokoúčinné kapalinové chromatografii převrácených fází (RP-HPLC) při nízkých vlnových délkách [13].

1.3.1.2 Oxidativní stres

Oxidační reakce jsou jedním z nejčastějších mechanismů degradace léčiva. Existují tři hlavní cesty pro oxidativní degradaci léčiva: radikálově iniciovaná reakce (autooxidace), peroxidem zprostředkovaná oxidace a oxidace zprostředkovaná elektronovým přenosem [16].

Mezi dva nejdůležitější testy oxidativního stresu se řadí autooxidace a peroxidem zprostředkovaná oxidace. Autooxidace je považována za radikálem zprostředkovaný proces [17]. Sloučeniny, které jsou citlivé na autooxidaci degradují v rozsahu větším než 10 % při vystavení teplotě 40 °C po dobu 48 hodin. Pokud se léčivý přípravek rozloží jen z několika jednotek procent, považuje se za stabilní vůči radikálově iniciované reakci [16].

Léčivé přípravky jsou vystavovány působení peroxidů, jelikož peroxidy se nacházejí v různých hladinách v pomocných látkách jako jsou např. polysorbáty, polyethylenglykoly, povidony či hydroxypropylcelulóza [18]. Hladiny peroxidů se mohou v průběhu oxidačních procesů zvyšovat. Proto je běžné, že léčivý přípravek je během svého životního cyklu vystaven právě peroxidům. Klasický test oxidativního stresu spočívá v rozpuštění účinné látky do zředěného vodného roztoku peroxidu vodíku (0,3 – 3%). Je vhodné kontrolovat hodnoty pH, aby se zajistilo, že jsou testovány všechny protonační stavy účinné látky (vhodné je testovat hodnoty pH o jednu jednotku vyšší/menší, než je hodnota pK_a). Testování oxidativního stresu s peroxidem vodíku by se mělo provádět za pokojové teploty. Použití vyšších teplot (např. vyšších než 30 °C) je riskantní z důvodu slabé O-O peroxidové vazby, která se za zvýšených teplot štěpí na hydroxylové radikály. Hydroxylové radikály se řadí mezi tvrdá oxidační činidla, která agresivně oxidují účinné látky léčiv a tvoří tak nereálné a nepředvídatelné degrační produkty. Místo toho se doporučuje vystavení účinných látek peroxidům při teplotě nižší

než 30 °C za tmy po dobu 1-7 dnů. Takovéto podmínky umožňují průběh neradikálovým oxidačním mechanismům degradace [16].

Hodnocení procentuální degradace u peroxidem zprostředkované degradace je obtížné. Je však empiricky dokázáno, že pokud dojde při vystavení účinné látky či léčivého přípravku 0,3% peroxidu vodíku v pufovaném vodném prostředí při pokojové teplotě k degradaci v rozsahu menším než 24 % za 24 hodin, není tato sloučenina považována za citlivou vůči působení peroxidů [19].

1.3.1.3 Termolytická degradace

Za termolytickou degradaci je považováno štěpení kovalentních vazeb v důsledku vystavení účinné látky léčiva vysokým teplotám (pyrolýza). Podle směrnice ICH je doporučeno testovat přírůstky teplot po 10 °C, aby se mohly studovat změny degradačních mechanismů v souvislosti s rostoucí teplotou, zejména v pevném stavu [9]. Studium vlivu přírůstků teplot je užitečné pro sestavování Arrheniových křivek, které by mohly umožnit predikci degradace účinných látek v pevném stavu při různých teplotách. Pro řadu nízkomolekulárních účinných látek je však potřeba testování po dobu několika měsíců, aby se získala relevantní kinetická data pro sestavování těchto křivek [20]. Při zvolení vhodné aktivační energie za předpokladu Arrheniovy kinetiky dochází při dlouhodobém vystavení účinné látky léčiva stresovým teplotám ke zvýšení obsahu jednotlivých degradačních produktů. Takovéto vystavení má tedy vliv i na rychlost degradace. Aby bylo možné predikovat rychlost degradace při určitých teplotách, je nutno vzít v úvahu i relativní vlhkost [21].

1.3.1.4 Fotolytická degradace

Fotolytická degradace je způsobena vystavením účinné látky léčiva ultrafialovému nebo viditelnému záření v rozsahu vlnových délek 300-800 nm. Vystavení účinné látky záření o nižší vlnové délce než 300 nm není nutné, jelikož s těmito vlnovými délkami se léčivý přípravek během skladování nebo distribuce nesetká. Na základě prvního fotochemického zákona („fotochemickou reakci látky může vyvolat pouze světlo jí absorbované“) platí, že k fotolytické degradaci dojde po absorpci záření buď účinnou látkou nebo pomocnými látkami, které se nacházejí v léčivém přípravku (tzv. formulacemi) [22].

Rychlost fotodegradace je přímo úměrná množství dopadajícího záření na molekulu či množství záření, které je absorbováno účinnou látkou nebo formulací. Léčivý přípravek může podléhat fotolytické degradaci, i když sám neabsorbuje záření v UV nebo VIS oblasti. To je způsobeno absorpcí záření pomocnými látkami ve formulaci či náhodně přítomnými látkami (nečistotami), které usnadňují absorpci záření a nacházejí se v léčivém přípravku [22].

Směrnice ICH (Q1B) odkazuje jak na zátěžové testování léčivých přípravků, tak na konfirmační testování. Konfirmační testování fotostability je navrhováno jako součást definitivního testování stability a lze jej považovat za analogické s urychleným testováním stability. Ve směrnici neexistuje žádný doporučený rozsah testovaných podmínek, avšak pro studium nucené degradace je doporučeno používat dvou až pětinasobek podmínek konfirmačního testování. Rozklad léčivého přípravku během tohoto testování by však neměl přesáhnout 10-20 % [22], [23].

1.4 Využití vysokoúčinné kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie ve farmaceutické analýze

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie má ve farmacii velmi široké uplatnění. Mezi typicky separované směsi se řadí antibiotika, sedativa, steroidy nebo analgetika [24]. HPLC se dále využívá pro stanovení čistoty výchozích surovin, stanovení čistoty vyrobené lékové formy a stanovení obsahu účinné látky v lékové formě. Během degradačních studií je HPLC využíváno pro vývoj a aplikaci analytických metod, které poskytují dostatečnou separaci všech detekovatelných nečistot či degradačních produktů, obsažených ve vzorku. Pro identifikaci těchto nečistot nebo degradačních produktů se používají spřažené (kombinované) metody, nejčastěji spojení kapalinové chromatografie s hmotnostním detektorem (LC – MS). Hmotnostní spektrometrie se využívá k identifikaci a stanovení léčiv v biologických tekutinách. Z hmotnostního spektra se získá molekulová hmotnost a sumární vzorec molekuly (při použití MS s vysokým rozlišením). Pokud je vzorek podroben fragmentaci, lze získat informace o přítomnosti či nepřítomnosti konkrétních funkčních skupin [25].

Pro analýzu komplexních směsí je tedy vhodné použít LC-MS. Toto spojení

poskytuje vyšší selektivitu díky možnosti sledování konkrétních hodnot m/z . Technikou LC-MS lze získat informaci nejen o molekulové hmotnosti a struktuře, ale i kvantitativní data. Při analýze komplexních směsí dochází někdy k nedostatečnému rozlišení jednotlivých složek vzorku, proto se stále častěji používá tzv. tandemová hmotnostní spektrometrie (LC-MS/MS), při které se spojují dva nebo více hmotnostních analyzátorů za sebou [26]. Ionty vznikající v iontovém zdroji jsou zavedeny do prvního hmotnostního analyzátoru, ze kterého jsou propouštěny do kolizní cely (reakční komory) pouze ionty o konkrétní hodnotě m/z . Ion opouštějící první hmotnostní analyzátor se nazývá prekurzorový ion. V kolizní cele se prekurzorové ionty fragmentují buď samovolně nebo dodáním energie (např. srážkami s reakčním plynem). Vzniklé ionty se nazývají produktové ionty a procházejí do druhého hmotnostního analyzátoru, kde jsou opět separovány podle m/z [27]. Nejčastějšími tandemovými hmotnostními spektrometry jsou trojitý kvadrupól nebo kvadrupól a iontová past. Toto spojení tedy přináší vyšší rozlišení, citlivost a specifickou detekci [26]. Velmi citlivá a specifická detekce určitého analytu je dosažena technikou MRM (z angl. *multiple reaction monitoring*), při které je sledován konkrétní přechod jednoho prekurzorového iontu na jeden produktový ion [27].

1.5 Metody stanovení canagliflozinu

Iqbal, Ezzeldin, Al-Rashood, Asiri a Rezk [28] popsali stanovení canagliflozinu pomocí UHPLC s MS detekcí. Experimentální měření byla prováděna na přístroji s trojitým kvadrupólem jako tandemovým hmotnostním spektrometrem. Bylo měřeno na koloně Acquity BEHTM C18 (100 × 2,1 mm, 1,7 μm), na které byla udržována teplota 40 °C. Mobilní fáze byla směs acetonitrilu a 10mM octanu amonného. Zastoupení obou složek bylo v průběhu analýzy isokratické v poměru 80:20, v/v. Průtok mobilní fáze byl 0,3 ml min⁻¹. Analyt eluoval v jedné minutě a celková doba analýzy trvala 1,5 minuty. Pro detekci hmotnostním spektrometrem byl jako iontový zdroj použit elektrosprej v negativním módu.

Saibaba, Pilli, Bimireddy a Pandiyan [29] ve svém článku popsali stanovení canagliflozinu pomocí HPLC-MS/MS. HPLC systém byl spojen s hmotnostním spektrometrem s trojitým kvadrupólem. Bylo měřeno na koloně Zodiac C18 (100 mm × 4,6 mm, 5 μm). Průtok mobilní fáze byl 0,1 ml min⁻¹ a její složení bylo 2mM

octan amonný a methanol. Zastoupení obou složek bylo isokratické v poměru 15:85, v/v. Pro detekci hmotnostním spektrometrem bylo měřeno v pozitivním módu a jako ionizační zdroj byl použit elektrosprej. Canagliflozin eluoval v čase 1,5 minuty a celková doba analýzy byla 2,5 minut.

Panigraphy a Reddy [30] publikovali ve svém článku stanovení canagliflozinu pomocí HPLC systému s DAD detektorem. Bylo měřeno na koloně Kromasil C18 (250 mm × 4,6 mm, 5 µm). Mobilní fáze byla složena z 0,01M octanu amonného o hodnotě pH 3,5 a acetonitrilu, 65:35, v/v. Průtok mobilní fáze byl 1 ml min⁻¹, výsledky byly zaznamenávány při vlnové délce detekce 254 nm. Canagliflozin eluoval v čase 3,7 minuty a celková doba analýzy byla 8 minut. V tomto článku byly zároveň popsány degradační studie canagliflozinu, které jsou dále popsány v odstavci 1.6

Emam a Abdelwahab [31] popsali stanovení canagliflozinu pomocí metody RP-HPLC s UV detekcí a vyvinutou metodu pak použili k zátěžovému testování API (viz odstavec 1.6). Pro chromatografickou separaci byla použita kolona Zorbax Eclipse C18 (250 mm × 4,6 mm, 5 µm) a mobilní fáze směs MetOH:H₂O, 98:2 %, v/v, která byla čerpána průtokem 1 ml min⁻¹. Vlnová délka detekce byla 225 nm, canagliflozin eluoval v čase 3,4 minuty a celková doba analýzy trvala 4 minuty.

Gurralla, Shivaraj, Subrahmanyam, Panikumar a Gowthami [32] publikovali ve svém článku stanovení canagliflozinu pomocí HPLC systému s UV detekcí. Vyvinutá metoda byla následně použita ke sledování výsledků z degradační studie canagliflozinu (viz odstavec 1.6). Pro chromatografickou separaci byla použita kolona SPOLAR C18 (250 × 4,6 mm, 5 µm), mobilní fází byla směs fosfátového pufru o hodnotě pH 6,0 a acetonitrilu (ACN) (55:45 %, v/v). Mobilní fáze byla čerpána průtokem 0,8 ml min⁻¹ a vlnová délka detekce byla 254 nm. Canagliflozin eluoval v čase 10,8 minut a celková doba analýzy byla 15 minut.

1.6 Zátěžové degradační studie canagliflozinu

Emam a Abdelwahab [31] popsali kompletní stabilitní studii canagliflozinu. Zátěžové testování zahrnovalo veškeré testy v rozsahu, který stanovuje ICH (2003), včetně testování alkalické i kyselé hydrolyzy v širokém rozsahu hodnot pH. Degradace byla sledována vyvinutou metodou RP-HPLC s UV detekcí (viz odstavec 1.5) a porovnávána s nedegradovaným standardem canagliflozinu. Hydrolytické testování bylo provedeno se vzorkem canagliflozinu v methanolu v přítomnosti 0,1M vodného roztoku hydroxidu sodného a 0,1M vodného roztoku kyseliny chlorovodíkové (MetOH:0,1M HCl/NaOH, 80:20 %, v/v) při teplotě 70 °C po dobu dvou hodin bez přístupu světla kvůli zamezení vlivu fotolytické degradace. Rozsah rozkladu canagliflozinu byl sledován u všech testovaných podmínek každých 30 minut. Chemická oxidace byla testována zahříváním vzorku canagliflozinu v methanolu pod zpětným chladičem v přítomnosti 3% vodného roztoku peroxidu vodíku (MetOH:3% H₂O₂, 80:20 %, v/v) při 70 °C po dobu dvou hodin bez přístupu světla. Termolytická degradace byla testována vystavením zásobního roztoku canagliflozinu v methanolu teplotě 70 °C po dobu 2 hodin. Rozsah rozkladu byl sledován každých 30 minut. Jako poslední byla testována fotolytická degradace. Vzorek canagliflozinu v methanolu byl vystaven působení UV lampy a kompletního bílého světla, jak doporučuje ICH předpis, po dobu 24 hodin. Degradace byla monitorována jako v předešlých případech. Canagliflozin byl stabilní vůči všem testovaným stresovým podmínkám s výjimkou oxidativního stresu. Během vystavení canagliflozinu oxidačním podmínkám vznikl jeden degradační produkt, který byl následně strukturně definován pomocí MS a infračervené spektroskopie (IR). Působením oxidativního stresu vznikl degradační produkt, ve kterém se primární alkohol v molekule canagliflozinu oxidoval na karboxylovou kyselinu. To bylo potvrzeno v hmotnostním spektru, ve kterém hodnota *m/z* degradačního produktu odpovídala hodnotě 458,4.

Gurralla, Shivaraj, Subrahmanyam, Panikumar a Gowthami [32] popsali zátěžové testování canagliflozinu, které zahrnovalo testování termolytické, hydrolytické (v kyselém, alkalickém i neutrálním prostředí), chemické a fotolytické degradace podle podmínek, které udává směrnice ICH Q1A. Termolytická degradace byla testována vystavením tenké vrstvy účinné látky 105 °C po dobu 48 hodin. Kyselé hydrolyzy byla testována vystavením vzorku canagliflozinu v 45% acetonitrilu 0,5M roztoku kyseliny

chlorovodíkové při 60 °C po dobu 60 minut. Poté byl ihned vzorek ochlazen a neutralizován 0,5M roztokem hydroxidu sodného. Podobně byly provedeny testy na alkalickou (0,5M hydroxid sodný) a na neutrální hydrolyzu (voda). Chemická oxidace byla testována vystavením vzorku canagliflozinu v 45% acetonitrilu 6% peroxidu vodíku při teplotě 60 °C po dobu 60 minut. Fotolytická degradace byla testována vystavením canagliflozinu UV záření o vlnových délkách 365 a 254 nm při teplotě 105 °C po dobu 48 hodin. Všechny testované vzorky byly následně analyzovány vyvinutou metodou HPLC (viz odstavec 1.5) a porovnávány se standardním vzorkem canagliflozinu. Významná degradace canagliflozinu byla pozorována při alkalické hydrolyze, při které se vzorek rozložil z 15,3 %. Degradace byla dále pozorována při chemické oxidaci léčiva, při níž se vzorek rozložil z 17,6 %. Při vystavení fotolytickým podmínkám se účinná látka rozložila z 22,5 %. Naopak vzorek canagliflozinu je stabilní při vystavení termolytickým podmínkám a vůči kyselé a neutrální hydrolyze.

Panigraphy a Reddy [30] popsali další degradační studii canagliflozinu, ve které byl testován vliv kyselé, neutrální a alkalické hydrolyzy, termolytických podmínek, chemické oxidace a fotolytické degradace. Kyselá hydrolyza byla testována vystavením vzorku canagliflozinu 2M kyselině chlorovodíkové při teplotě 60 °C po dobu 30 minut. Neutrální hydrolyza byla testována ponecháním vzorku canagliflozinu ve vodě při 60 °C po dobu 6 hodin. Alkalická hydrolyza byla testována vystavením vzorku canagliflozinu 2M hydroxidu sodnému při teplotě 60 °C po dobu 30 minut. Testování oxidativního stresu bylo provedeno vystavením vzorku canagliflozinu 3% peroxidu vodíku při teplotě 60 °C po dobu 30 minut. Termolytická degradace byla testována umístěním účinné látky canagliflozinu do pece o teplotě 105 °C po dobu 6 hodin (s nulovou relativní vlhkostí). Fotolytická degradace byla testována vystavením vzorku canagliflozinu UV záření v UV degradační komoře po dobu 7 dní. Všechny testované vzorky byly následně analyzovány vyvinutou metodou RP-HPLC (viz odstavec 1.5) a porovnávány se standardním vzorkem canagliflozinu. Canagliflozin je podle této studie stabilní vůči alkalické a neutrální hydrolyze, termolytickým podmínkám a fotolytické degradaci. Při vystavení canagliflozinu oxidativnímu stresu a kyselé hydrolyze dochází k největšímu rozkladu. Při působení peroxidu vodíku se vzorek rozložil z 3,10 % a během působení kyseliny chlorovodíkové se vzorek rozložil z 4,37 %.

S ohledem na výsledky výše uvedených článků, byl výzkum popsáný v této práci

zaměřen na oxidativní degradaci s cílem detailněji popsat vliv jednotlivých podmínek (např. vliv obsahu vody či methanolu v rozpouštědle vzorku nebo vliv kyselého či zásaditého prostředí) na rychlost degradace a prozkoumat vznikající oxidační produkty.

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 Použité chemikálie a přístroje

2.1.1 Chemikálie

- Acetonitril CHROMASOLV®, for HPLC, gradient grade $\geq 99,9\%$, Honeywell, Francie
- Methanol, CHROMASOLV®, for HPLC, gradient grade $\geq 99,9\%$, Honeywell, Francie
- Hydroxid amonný, 25% p. a., Lach-Ner, s. r. o. Česká republika
- Kyselina mravenčí, 99% p. a., Lach-Ner, s. r. o. Česká republika
- Kyselina sírová, 96% p.a., Lach-Ner, s. r. o. Česká republika
- Kyselina chlorovodíková, 37% p.a., VWR Chemicals, International S. A. S. Francie
- Hydroxid sodný p.a., Penta s. r. o. Česká republika
- Peroxid vodíku 30% p.a., Lach-Ner, s. r. o. Česká republika
- Deionizovaná voda připravená systémem Milli-Q, Millipore, USA
- Stearan hořečnatý, Spectrum Chemical Mfg. Corp., USA
- Hydroxypropylcelulóza, Spectrum Chemical Mfg. Corp., USA
- Sodná sůl kroskarmelózy (Ac-Di-Sol), Spectrum Chemical Mfg. Corp., USA
- Laktóza, Spectrum Chemical Mfg. Corp., USA
- Mikrokrytalická celulóza (Avicel), Spectrum Chemical Mfg. Corp., USA

2.1.2 Instrumentace

- HPLC, 1200 Series, Agilent Technologies, Německo
- UHPLC Infinity 1290, MS 6460, QqQ, Agilent Technologies, Německo
- Kolona Agilent Poroshell 120 SB-Aq ($2,1 \times 100$ mm, $2,7 \mu\text{m}$)
- Degradační komora Memmert Humidity Chamber HCP, Memmert, Německo
- Ultrazvuková lázeň, Elma, S15 Elmasonic, Německo
- Analytické váhy, 262 SMA-FR, Precisa, Švýcarsko
- Odstředivka, Ependorf MiniSpin, USA
- pH metr, 3540 pH/conductivity meter, Jenway, UK
- Magnetická míchačka, CIMAREC i Mono, Thermo scientific, USA

2.2 Příprava vzorků a kalibračních roztoků

2.2.1 Příprava vzorků pro testování rozpustnosti

Vzorek API canagliflozinu byl navážen na analytických váhách tak, aby koncentrace ve vialce byla přibližně 1 mg ml^{-1} . Pro urychlení rozpouštění se vialka se vzorkem vložila do ultrazvukové lázně na 5 minut. Rozpustnost se hodnotila vizuálně.

2.2.2 Příprava kalibračních roztoků

Kalibrační roztoky byly připraveny postupným ředěním zásobního roztoku API. Nejkoncentrovanější roztok o koncentraci 10 mg ml^{-1} byl připraven odvážením $100,0 \text{ mg}$ API a rozpouštěním v 10 ml ACN. Následně byl vzorek vložen do ultrazvukové lázně na 10 minut. Jednotlivé koncentrace kalibračních roztoků ve směsi $\text{H}_2\text{O}:\text{ACN}$ v objemovém poměru 70:30 odpovídaly 0,5, 0,3, 0,1, 0,05, 0,01, $5 \cdot 10^{-3}$, $1 \cdot 10^{-3}$, $5 \cdot 10^{-4}$, $2 \cdot 10^{-4}$, $5 \cdot 10^{-5}$ a $2 \cdot 10^{-5} \text{ mg ml}^{-1}$.

2.2.3 Příprava roztoků pro vlastní měření

2.2.3.1 Příprava vzorků pro vývoj analytické metody

Vzorek API canagliflozinu pro vývoj metody byl připraven navážením příslušného množství API na analytických váhách a rozpuštěním ve směsi $\text{H}_2\text{O}:\text{ACN}$ v objemovém poměru 70:30 tak, aby koncentrace ve vialce odpovídala $0,4 - 0,5 \text{ mg ml}^{-1}$. Následně byl vzorek vložen do ultrazvukové lázně a ponechán 5 minut sonifikovat. Takto připravený vzorek byl umístěn do degradační komory a ponechán při teplotě 50°C po dobu 24 – 68 hodin.

Vzorek API canagliflozinu spolu s excipienty, které se přidávají do tablety Invokana byl připraven pro testování opakovatelnosti a výtěžnosti metody. Excipienty, které se přidávaly ke vzorku byly stearan hořečnatý, hydroxypropylcelulóza, sodná sůl kroskarmelózy (vnitřně zesíťovaná sodná sůl karboxymethylcelulózy, Ac-Di-Sol), laktóza a mikrokrystalická celulóza (Avicel). Ke vzorku canagliflozinu o koncentraci $0,5 \text{ mg ml}^{-1}$ byla přidána směs deklarovaných excipientů tak, aby koncentrace ve vialce byla přibližně $0,25 \text{ mg ml}^{-1}$. Poté byl vzorek vložen do ultrazvukové lázně a ponechán 5 minut sonifikovat, následně byl vzorek odstředěn 5 minut při 14 500 rpm.

2.2.3.2 Příprava vzorků pro zátěžové testování

Vzorky pro zátěžové testování byly připraveny v triplikátech postupným ředěním zásobních roztoků API o koncentraci 10 mg ml^{-1} v ACN nebo MetOH. Koncentrace vzorku pro stresové testování odpovídala hodnotě $0,5 \text{ mg ml}^{-1}$ a byla testována různá rozpouštědla vzorku, která jsou uvedena v Tab. 2.1. Jako oxidační činidlo byl zvolen 3% H_2O_2 . Vzorky byly připraveny v triplikátech a ponechány v degradační komoře při teplotě 50°C po dobu 1, 2 a 3 dní. Zároveň byla testována degradace za laboratorní teploty po dobu 4 – 7 dní ve vzorcích s 30% ACN + 3% H_2O_2 , 50% ACN + 3% H_2O_2 a 50% MetOH + 3% H_2O_2 .

Tab. 2.1: Testované podmínky pro zátěžové testování vzorku API canagliflozinu o koncentraci 0,5 mg ml⁻¹.

Vzorek	Rozpouštědlo (% , v/v)	Oxidační činidlo
A	ACN:H ₂ O, 50:50	-
B	ACN:H ₂ O, 30:70	-
C	MetOH:H ₂ O, 50:50	-
D	MetOH:H ₂ O, 50:50	3% H ₂ O ₂
E	ACN:H ₂ O, 50:50	3% H ₂ O ₂
F	ACN:H ₂ O, 30:70	3% H ₂ O ₂
G	ACN:H ₂ O, 30:70 + 0,1M H ₂ SO ₄	3% H ₂ O ₂
H	ACN:H ₂ O, 30:70 + 0,1M NaOH	3% H ₂ O ₂
I	ACN:H ₂ O, 30:70 + 0,1M H ₂ SO ₄	-
J	ACN:H ₂ O, 30:70 + 0,1M NaOH	-
K	ACN:H ₂ O, 30:70 + 0,1M HCl	3% H ₂ O ₂
L	ACN:H ₂ O, 30:70 + 0,1M HCl	-

2.3 Chromatografické podmínky

Mobilní fáze byla směs vodné a organické složky. Vodná složka (složka A) obsahovala 10mM vodný roztok kyseliny mravenčí, pH bylo ve výsledném objemu mobilní fáze upraveno hydroxidem amonným na hodnotu 3,5. Organickou složku (složku B) tvořil ACN a zastoupení obou složek se měnilo podle gradientového programu, který je uveden v Tab. 2.2.

Separace byla prováděna na koloně Agilent Poroshell 120 SB-Aq ($2,1 \times 100$ mm, $2,7 \mu\text{m}$), dávkovaný objem vzorku byl $1 \mu\text{l}$, průtok mobilní fáze byl $0,4 \text{ ml min}^{-1}$, teplota kolony byla 30°C a teplota autosampleru byla 15°C . Detekce byla prováděna na detektoru s diodovým polem. Pro detekci byla zvolena vlnová délka 292 nm . Pro studium hlavních degradačních produktů byl použit MS detektor. Jako iontový zdroj sloužil elektrosprej (teplota dusíku: 300°C , průtok dusíku 8 l min^{-1} , tlak zmlžovače: 276 kPa , napětí na vstupní kapiláře: 4000 V).

Tab. 2.2: Gradientový program, podle kterého se měnilo zastoupení vodné (A) a organické složky (B) mobilní fáze v průběhu eluce.

$t \text{ (min)}$	$\phi_A \text{ (\%)}$	$\phi_B \text{ (\%)}$
0	70	30
1	70	30
10	60	40
12	20	80
13	20	80
14	70	30
20	70	30

2.4 Analytické zpracování dat

2.4.1 Mez detekce a kvantifikace

Mez detekce, LOD, a mez kvantifikace, LOQ, canagliflozinu pro tuto analytickou metodu byly vypočteny dle následujících rovnic:

$$LOD = \frac{3,3 \times \sigma}{a} \quad (2.1),$$

$$LOQ = \frac{10 \times \sigma}{a} \quad (2.2),$$

kde σ je průměrná amplituda šumu z chromatogramů rozpouštědla vzorku a a je směrnice přímky závislosti výšky píku na koncentraci canagliflozinu [33].

2.4.2 Linearita a lineární dynamický rozsah

Linearita byla vyhodnocena prostřednictvím koeficientu linearity, tedy vynesáním logaritmických hodnot příslušných koncentrací kalibračních roztoků na osu x a logaritmických hodnot plochy píku na osu y . Těmito body byla proložena regresní přímka. Směrnice přímky odpovídala koeficientu linearity měření. Lineární dynamický rozsah metody odpovídal hodnotám od meze kvantifikace do nejvyšší koncentrace, pro které byla prokázána lineární kalibrační závislost.

2.4.3 Opakovatelnost

Opakovatelnost vyvinuté metody byla zjištěna ze 7 po sobě jdoucích měření vzorku API s excipienty ihned po přípravě vzorku a po 4 dnech. Vyhodnocení opakovatelnosti bylo provedeno pomocí výpočtu směrodatné odchylky (viz rovnice 2.3) a relativní směrodatné odchylky (viz rovnice 2.4) podle následujících vzorců:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (2.3),$$

kde s je směrodatná odchylka měření, x_i je prvek ze statistického souboru o indexu i , \bar{x} je aritmetický průměr hodnot signálu a n je počet měření

$$s_r, \% = 100 \frac{s}{\bar{x}} \quad (2.4),$$

kde $s_r, \%$ je relativní směrodatná odchylka měření v procentech [34].

2.4.4 Výtěžnost (pravdivost) metody

Výtěžnost byla určena proměřením vzorků API canagliflozinu o koncentraci $0,3$ a $5 \cdot 10^{-3}$ mg ml⁻¹ v přítomnosti excipientů, které se přidávají do tablety Invokana během výroby. Z plochy naměřeného píku byla vypočtena na základě rovnice kalibrační závislosti odpovídající koncentrace. Výtěžnost metody pak odpovídá poměru koncentrace analytu, která byla získána vyvinutou analytickou metodou a referenční koncentrace analytu.

2.4.5 Přenos vzorku mezi měřeními

Přenos vzorku mezi měřeními byl zjištěn proměřením vzorku API canagliflozinu o koncentraci $0,5$ mg ml⁻¹ spolu s přidávanými excipienty a následným čtyřnásobným proměřením rozpouštědla vzorku. Přenos vzorku pak odpovídal poměru plochy píku API při měření čistého rozpouštědla vzorku a plochy píku API ve vzorku.

3 VÝSLEDKY A DISKUZE

3.1 Vývoj analytické metody

3.1.1 Rozpustnost účinné látky

Rozpustnost API canagliflozinu v různých rozpouštědlech byla testována odvážením 1,0 mg API s přidáním 1,00 ml daného rozpouštědla a hodnocena vizuálně po sonifikaci. Na základě provedených experimentů bylo zjištěno, že vzorek API je lépe rozpustný v ACN než v MetOH. Při testování rozpustnosti ve směsích ACN a vody se vzorek vysrážel v 25% (v/v) ACN, při obsahu ACN 30 % (v/v) a více se vzorek rozpustil. Při testování rozpustnosti ve směsích MetOH a vody se vzorek vysrážel již při 40% objemovém zastoupení MetOH. Rozpustný byl v koncentracích MetOH 50 % a výše. Vzorek API byl následně testován i ve vodném roztoku 10mM HCOOH, který byl upraven pomocí NH₄OH na hodnotu pH 3,57, který měl být použit jako jedna z komponent mobilní fáze. Zde k vysrážení došlo až při 20% objemovém zastoupení ACN. Při obsahu ACN 25 % (v/v) a více byl vzorek rozpustný. Kyselé prostředí tedy zvýšilo rozpustnost canagliflozinu.

3.1.2 Volba optimálního gradientového programu

Měření probíhalo na koloně Agilent Poroshell 120 SB-Aq (2,1 × 100 mm, 2,7 μm), která je vhodná pro separaci v kyselém prostředí. Kyselé prostředí bylo zvoleno na základě informací z literární rešerše a kvůli dobré rozpustnosti API v tomto prostředí. Mobilní fází byla směs pufru a ACN. Puffer se skládal z 10 mM vodného roztoku HCOOH, který byl upraven pomocí NH₄OH na hodnotu pH 3,5. Gradientová eluce umožňuje zkrácení doby analýzy, tím i snížení spotřeby jednotlivých rozpouštědel a zároveň je nástrojem pro zajištění selektivity na analytické koloně. Proto byl hledán takový gradient, který umožní oddělení canagliflozinu a jeho degradačních produktů v co nejkratším čase. Při použití původního lineárního gradientu (čas, min/obsah organické složky, %): 0/30, 1/30, 12/80, 14/80, 15/30, 16/30 docházelo k brzké eluci API canagliflozinu, tudíž by nedocházelo k dostatečnému oddělení polárních degradačních produktů od hlavního píku. Proto byl použit pozvolný gradient (viz Tab. 3.1), aby mohly být pozorovány a dostatečně separovány polární i nepolární degradační produkty. Další problém, který se při hledání

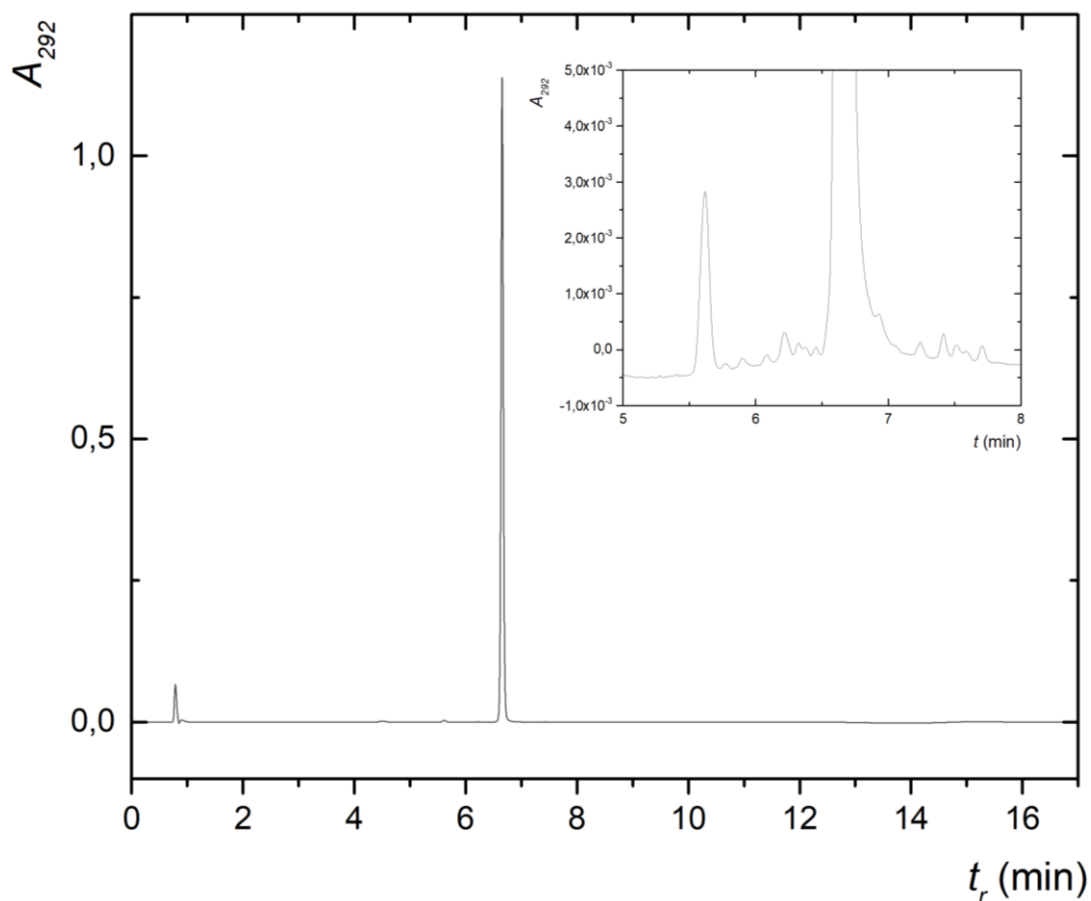
vhodného gradientového programu objevil, bylo, že nebyl ponechán dostatečně dlouhý čas na konci analýzy pro návrat systému do počátečních podmínek. To se při opakovaném dávkování projevilo dřívější elucí účinné látky kvůli tomu, že na začátku analýzy byl na koloně vyšší obsah ACN v mobilní fázi. Vyvinutý gradient lze vidět v Tab. 3.1

Tab. 3.1: Původní vyvinutý gradientový program.

t (min)	ϕ_A (%)	ϕ_B (%)
0	70	30
1	70	30
6	60	40
7	60	40
8	20	80
10	20	80
11	70	30
17	70	30

Za těchto podmínek byl získán pík API uspokojivého tvaru (faktor symetrie byl 0,91 a počet teoretických pater 117 700), který eluoval v čase 6,8 min. API vykazovala dostatečnou retenci a oddělení od mrtvého času, zároveň ale neeluovala v příliš vysokém obsahu ACN, kde se z kolony mohou vymývat nepolární silně zadržované látky a nebýt dostatečně rozdělené. Následně byl vzorek API o koncentraci 0,5 mg ml⁻¹ v ACN ponechán v degradační komoře v přítomnosti 3% H₂O₂ při teplotě 50 °C po dobu 15 a 68 hodin. Testovalo se oddělení degradačních produktů od hlavního píku API.

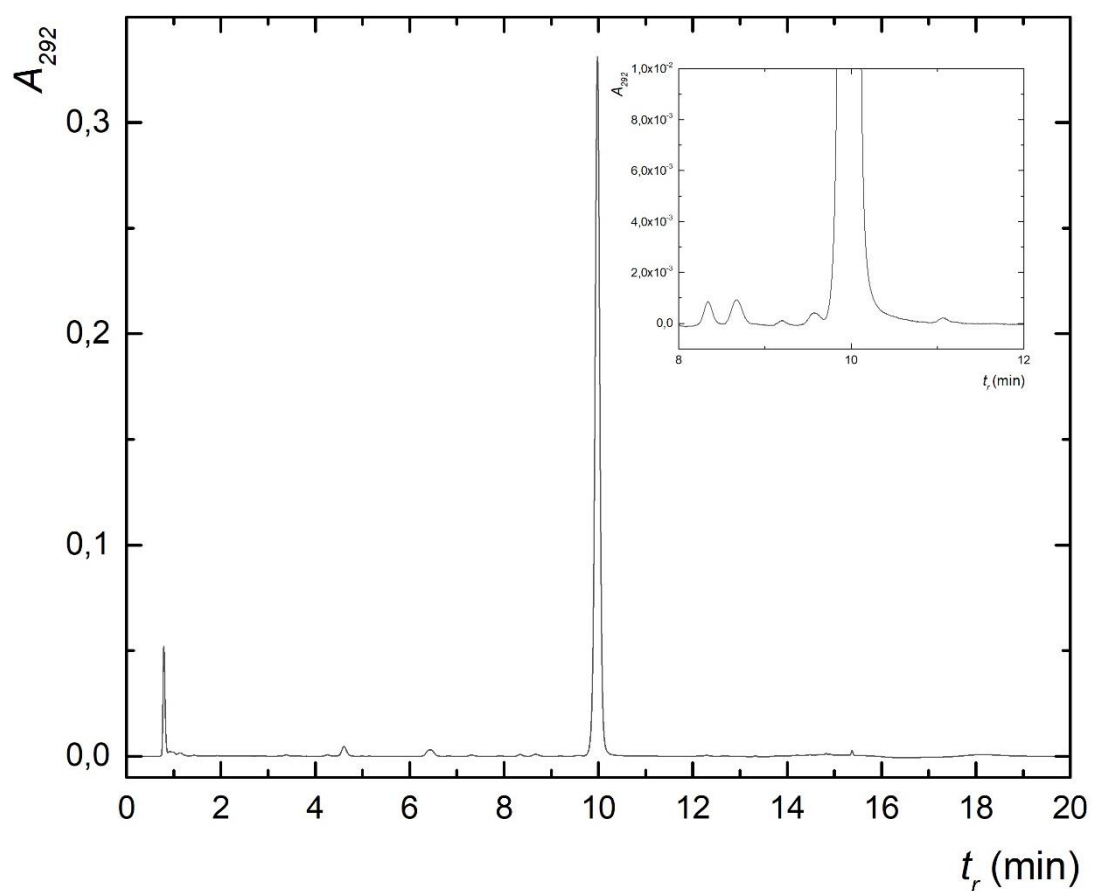
Při použití gradientu dle Tab. 3.1 nedošlo k oddělení degradačních produktů od hlavního píku (viz Obr. 3.1), proto se testovaly různé gradienty za účelem zvýšení rozlišení sousedních degradačních produktů od hlavního píku. Při použití pozvolného dvacetiminutového gradientu (viz Tab. 3.2) eluoval pík API (t_r = 10,0 min) s nižší účinností (počet teoretických pater byl 46 900), nicméně v tomto chromatogramu měl pík lepší symetrii (hodnota faktoru symetrie byla 1,04) a lze vidět dostatečné oddělení degradačních produktů (viz Obr. 3.2).



Obr. 3.1: Chromatogram vzorku canagliflozinu o koncentraci $0,5 \text{ mg ml}^{-1}$ v ACN v přítomnosti 3% H_2O_2 ponechaný v degrační komoře při 50°C po dobu 15 hodin při použití gradientu v Tab. 3.1. Degradací produkty nebyly dostatečně odděleny od hlavního píku.

Tab. 3.2: Upravený gradient vhodný pro oddělení degračních produktů od hlavního píku API canagliflozinu.

$t \text{ (min)}$	$\phi_A \text{ (\%)}$	$\phi_B \text{ (\%)}$
0	70	30
1	70	30
10	60	40
12	20	80
13	20	80
14	70	30
20	70	30



Obr. 3.2: Chromatogram vzorku canagliflozinu o koncentraci $0,5 \text{ mg ml}^{-1}$ ponechaný v přítomnosti 3% H_2O_2 v degradační komoře při 50°C po dobu 68 hodin při použití upraveného dvacetiminutového gradientu. Oddělení degradačních produktů od hlavního píku je již dostatečné.

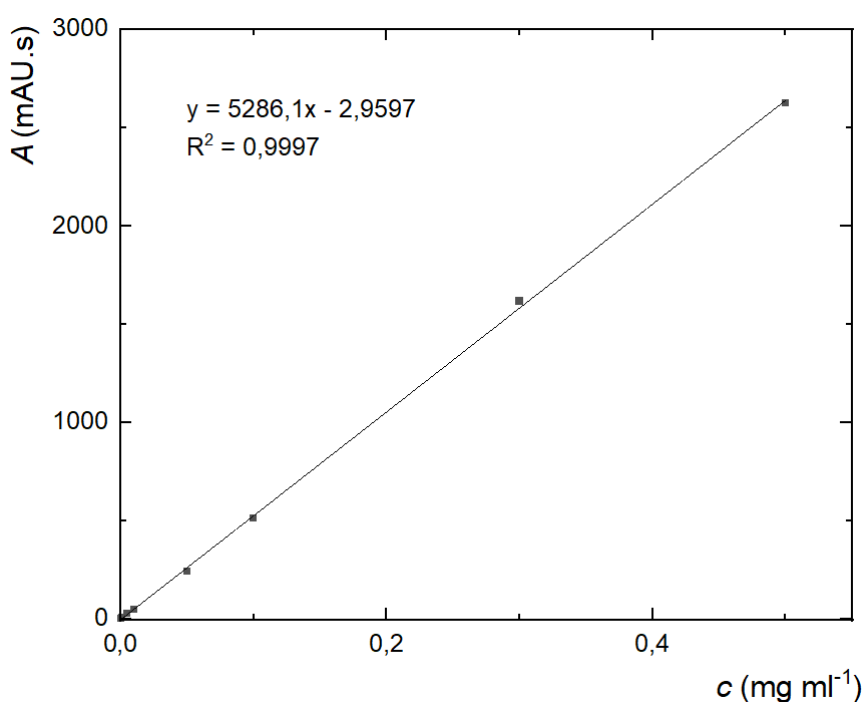
3.1.3 Porovnání vyvinuté metody s metodami v literární rešerši

Jedním z cílů této práce bylo vyvinout analytickou metodu, která by umožňovala studium degradačních produktů pomocí UV a MS detektoru. Vyvinutá metoda umožňovala díky přítomnosti těkavých složek v mobilní fázi (kyseliny mravenčí a mravenčanu amonného) stanovení pomocí UV i MS detektoru beze změny mobilní fáze u různých typů detektorů. Kyselé prostředí bylo zvoleno s ohledem na výsledky testování rozpustnosti canagliflozinu. Metoda, vyvinutá v této práci, poskytovala díky gradientové eluci kompromis mezi rychlostí analýzy a dostatečnou selektivitou metody. Metody uvedené v odstavci 1.5 popisují čerpání mobilní fáze isokraticky ve vysokém poměru organického modifikátoru a vodné složky mobilní fáze (např. 80:20 %, v/v). Takovéto nastavení vedlo k velmi krátké celkové době analýzy. Ve vyvinuté metodě byla celková doba analýzy 20 minut. Nicméně opětovným testováním vhodného gradientu, analýzou vzorku s excipienty a degradovaného vzorku (viz Obr. 3.2) bylo ověřeno, že v retenčním čase API nejsou vymývány žádné oxidační degradačních produkty a metoda je tak selektivní a pro degradační studie je vhodnější než metody popsané v odstavci 1.5.

3.2 Validace metody

3.2.1 Kalibrační závislost

Po vyvinutí analytické metody byly proměřeny kalibrační roztoky o koncentracích 0,5, 0,3, 0,1, 0,05, 0,01, $5 \cdot 10^{-3}$, $1 \cdot 10^{-3}$ a $5 \cdot 10^{-4} \text{ mg ml}^{-1}$ pro zjištění závislosti odezvy detektoru na koncentraci canagliflozinu. Následně byla sestrojena kalibrační závislost hodnot plochy píku na koncentraci daného kalibračního roztoku (viz. Obr. 3.3). Body byly proloženy regresní přímkou (metoda nejmenších čtverců) a byl vypočten koeficient determinace, jehož hodnota byla 0,9997.



Obr. 3.3: Kalibrační závislost hodnot plochy píku na koncentraci daného kalibračního roztoku. Podmínky měření: kolona: Agilent Poroshell 120 SB-Aq ($2,1 \times 100 \text{ mm}$, $2,7 \text{ }\mu\text{m}$), mobilní fáze: směs pufru (10 mM HCOOH/NH_3) o pH 3,52 a ACN, gradientový program dle Tab. 3.2, teplota kolony: $30 \text{ }^\circ\text{C}$, vlnová délka detekce: 292 nm , nástřik vzorku: $1 \text{ }\mu\text{l}$, průtok mobilní fáze: $0,4 \text{ ml min}^{-1}$.

3.2.2 Vyhodnocení analytických parametrů

Mez detekce a mez kvantifikace byly vypočteny podle rovnic 2.1 a 2.2. Pro výpočet byla použita směrnice regresní přímky z kalibrační závislosti hodnot výšky píku na koncentraci daného kalibračního roztoku, která odpovídala hodnotě 677 mAU ml mg⁻¹. Šum základní linie byl vyhodnocen z chromatogramu slepého vzorku a odpovídal hodnotě 0,02 mAU. Hodnota LOD odpovídala 8,9·10⁻⁵ mg ml⁻¹ (2,0·10⁻⁷ mol l⁻¹) a hodnota LOQ odpovídala 3,0·10⁻⁴ mg ml⁻¹ (6,8·10⁻⁷ mol l⁻¹). Hodnoty byly ověřeny experimentálně. Koeficient linearit dané metody byl vypočten vynesemím logaritmických hodnot koncentrace na osu *x* a logaritmických hodnot ploch píku na osu *y* (viz Obr. 3.4). Ze směrnice rovnice regresní přímky byla určena hodnota koeficientu linearit, která odpovídala 0,9517 po vyloučení kalibračních roztoků o koncentracích 2·10⁻⁴, 5·10⁻⁵ a 2·10⁻⁵ mg ml⁻¹, které ležely pod hodnotou LOQ. V rozsahu kalibračních roztoků od 5·10⁻⁴ do 0,5 mg ml⁻¹ se směrnice regresní přímky nelišila od hodnoty 1 o více než 5 %, lze tedy říci, že odezva detektoru je lineární v tomto rozsahu testovaných koncentrací a lineární dynamický rozsah metody je 3,0·10⁻⁴ – 0,5 mg ml⁻¹.

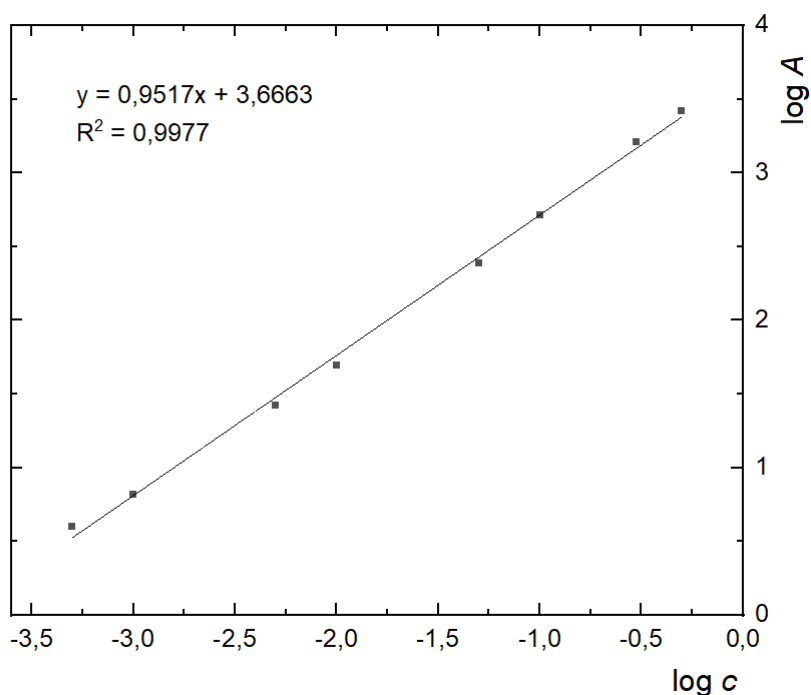
Opakovatelnost měření byla určena ze sedmi po sobě jdoucích měření vzorku API v přítomnosti excipientů, které se přidávají do tablety Invokana, aby byl zahrnut případný vliv matrice. Opakovatelnost byla hodnocena na dvou koncentračních hladinách, a to 0,3 mg ml⁻¹ a 5·10⁻³ mg ml⁻¹ na základě relativní směrodatné odchylky, která byla vypočtena podle rovnic 2.3 a 2.4. Pro koncentraci 0,3 mg ml⁻¹ byla opakovatelnost retenčního času 0,17 % a plochy píku 0,75 %. Pro koncentraci 5·10⁻³ mg ml⁻¹ byla opakovatelnost retenčního času 0,18 % a plochy píku 1,58 %. Následně byla testována opakovatelnost měření již připraveného vzorku s excipienty po 4 dnech. Pro koncentraci 0,3 mg ml⁻¹ byla opakovatelnost retenčního času 0,06 % a plochy píku 0,61 %. Pro koncentraci 5·10⁻³ mg ml⁻¹ byla opakovatelnost retenčního času 0,12 % a plochy píku 1,38 %. Relativní směrodatná odchylka je ve farmaceutické analýze zpravidla limitována hodnotou 2 %. Pokud je přesažena tato hodnota, metoda není dostatečně precizní. Z hodnot relativních směrodatných odchylek pro retenční čas i plochu píku vyplývá, že daná metoda je precizní.

Výtěžnost byla určena proměřením vzorků API canagliflozinu o koncentraci 0,3 a 5·10⁻³ mg ml⁻¹ v přítomnosti excipientů. Z plochy naměřeného píku byla vypočtena na základě rovnice kalibrační závislosti odpovídající koncentrace. Pro koncentraci

0,3 mg ml⁻¹ byla výtěžnost metody 104,2 % a pro koncentraci 5·10⁻³ mg ml⁻¹ byla výtěžnost metody 117,5 %. Výtěžnost vypovídá o pravdivosti (správnosti) metody. Míra odchýlení u koncentrace 0,3 mg ml⁻¹ byla do 5 %, a pro koncentraci 5·10⁻³ mg ml⁻¹ byla 17,5 %. Lze tedy říci, že pro vyšší koncentrace je vyvinutá metoda pravdivější (správnější).

Matricový slepý vzorek byl připraven ze samotných excipientů v rozpouštědle vzorku bez API. V chromatogramu se neobjevoval žádný pík v čase eluce hlavního píku, tudíž stanovení canagliflozinu není ovlivněno přidanými excipienty.

Dále byl testován přenos vzorku mezi měřeními, který byl zjištěn proměřením vzorku API canagliflozinu o koncentraci 0,5 mg ml⁻¹ spolu s přidanými excipienty a následným čtyřnásobným proměřením rozpouštědla vzorku. Přenos vzorku API mezi prvním a druhým měřením odpovídal 0,15 %. Mezi prvním a dalšími měřeními se již přenos snížil a ustálil na hodnotě 0,05 %.

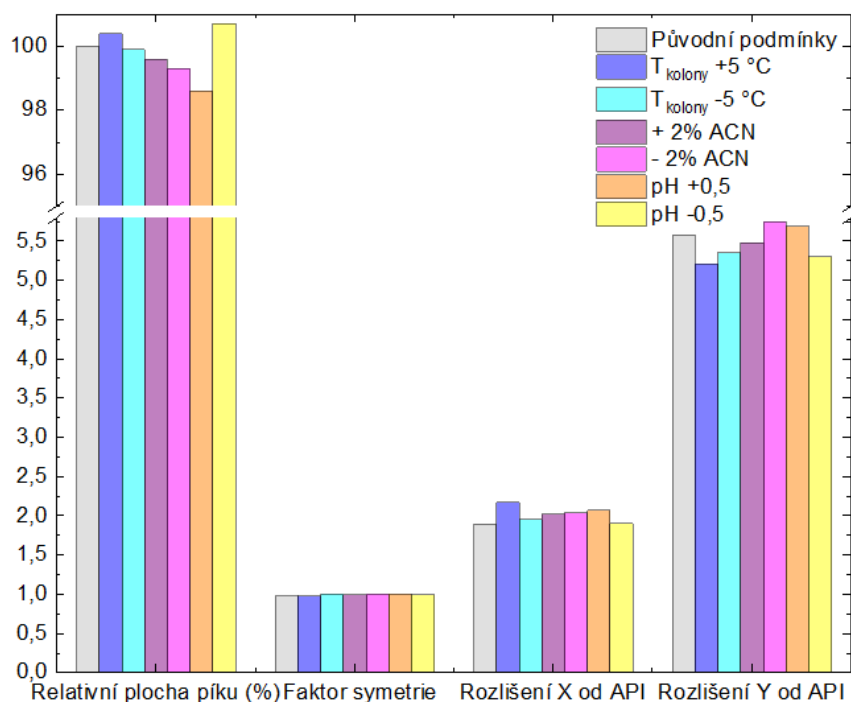


Obr. 3.4: Závislost logaritmických hodnot ploch píků na logaritmických hodnotách koncentrací jednotlivých kalibračních roztoků. Ze směrnice regresní přímky byla odečtena hodnota koeficientu linearity 0,9517 a určen lineární dynamický rozsah metody: 3,0·10⁻⁴ – 0,5 mg ml⁻¹.

3.2.3 Robustnost

Při testování robustnosti vyvinuté metody byly sledovány s mírnou změnou jednotlivých chromatografických podmínek tyto kritické parametry: plocha hlavního píku, faktor symetrie hlavního píku a rozlišení dvou nejbližších degradačních produktů X a Y od hlavního píku. Robustnost metody byla testována vůči změně teploty o 5 °C, změně obsahu organické složky v mobilní fázi o 2 % (v/v) a změně pH vodné složky mobilní fáze o hodnotu 0,5.

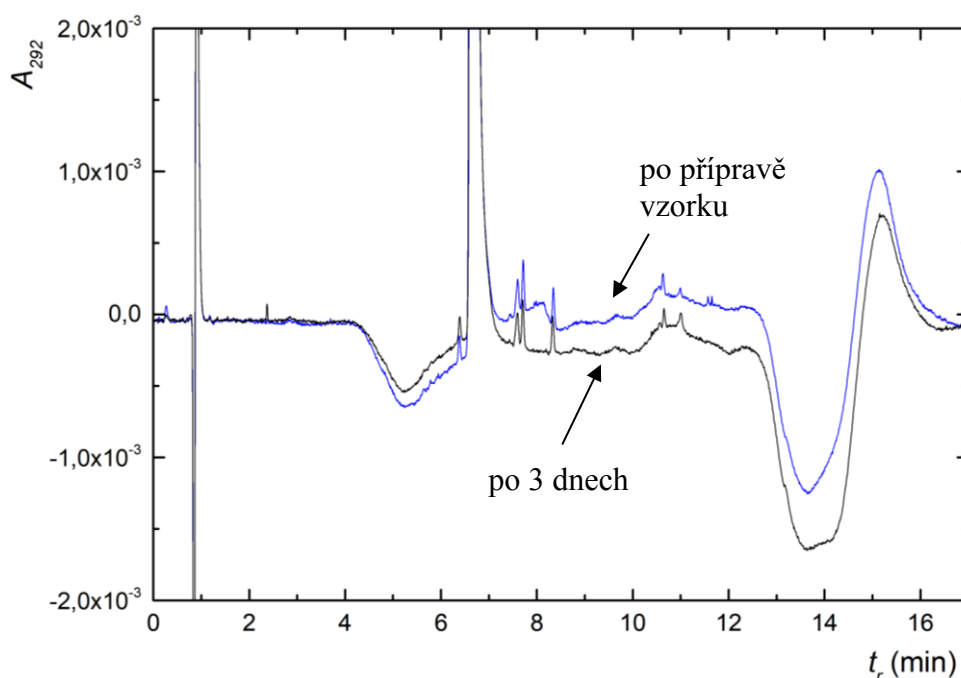
Výsledky testování robustnosti lze vidět na Obr. 3.5. Změna hodnoty pH měla největší vliv na plochu píku API, její odchylka od původní hodnoty byla maximálně 1,4 %. Změna teploty kolony měla největší vliv na hodnotu rozlišení degradačních produktů od píku API. Nejnižší rozlišení degradačního produktu od píku API bylo 1,95 při snížení teploty kolony o 5 °C, což je vyšší než hraniční hodnota rozlišení 1,5, která udává, jestli jsou od sebe dva sousední píky navzájem odděleny. Faktor symetrie byl z testovaných kritických parametrů nejméně ovlivněn změnou dílčích podmínek. Odchylka faktoru symetrie (0,02 %) byla pozorována u snížení teploty kolony o 5 °C, u snížení obsahu organické složky v mobilní fázi o 2 % a u zvýšení hodnoty pH mobilní fáze o 0,5. Z Obr. 3.5 a z odchylek od původních hodnot je patrné, že metoda je robustní vůči mírným odchylkám teploty, obsahu organické složky a pH.



Obr. 3.5: Závislost plochy hlavního píku, faktoru symetrie, a rozlišení degradačních produktů X a Y od hlavního píku na změnách dílčích podmínek. Vzorek API o koncentraci $0,5 \text{ mg ml}^{-1}$ v rozpouštědle vzorku ACN:H₂O, 50:50 %, v/v s přídavkem 3% H₂O₂, ponechaný v degradační komoře při 50 °C po dobu 68 hodin. Z obrázku je patrné, že metoda je robustní vůči mírným odchylkám teploty, obsahu organické složky v mobilní fázi a pH.

3.2.4 Stabilita v rozpouštědle vzorku

Vyvinutá metoda byla použita k měření stability roztoku API canagliflozinu v rozpouštědle vzorku ACN:H₂O, 30:70 %, v/v. Vzorek byl měřen ihned po přípravě, dále po jednom, po dvou a po třech dnech, kdy byl vzorek ponechán v autosampleru při 15 °C. Výsledné chromatogramy ihned po přípravě vzorku a po 3 dnech lze vidět na Obr. 3.6. V původním vzorku bylo přítomné malé množství nečistot, které se nezměnilo. Stejně tak nepřibýly nečistoty nové. Roztok API v rozpouštědle vzorku ACN:H₂O, 30:70 %, v/v je tedy v rozmezí tří dnů při teplotě 15 °C stabilní.



Obr. 3.6: Chromatogramy vzorku API canagliflozinu v rozpouštědle ACN:H₂O, 30:70 %, v/v po přípravě vzorku (modrý chromatogram) a po třech dnech (černý chromatogram) při ponechání při teplotě 15 °C. Z chromatogramů je patrné, že vzorek canagliflozinu je v rozmezí tří dnů v rozpouštědle ACN:H₂O, 30:70 %, v/v při teplotě 15 °C stabilní.

3.3 Zátěžová degradační studie canagliflozinu

Vzorek API byl vystaven zátěžovým podmínkám, při kterých se testovala jeho stabilita v různých rozpouštědlech vzorku (viz Tab. 2.1) při teplotě 50 °C v přítomnosti 3% H₂O₂ po dobu 1 – 3 dnů a zároveň se testovala rychlost degradace při laboratorní teplotě během 4 – 7 dní. Metoda vyvinutá v této práci byla použita ke sledování obsahu nečistot ve vzorcích podrobených chemické oxidaci.

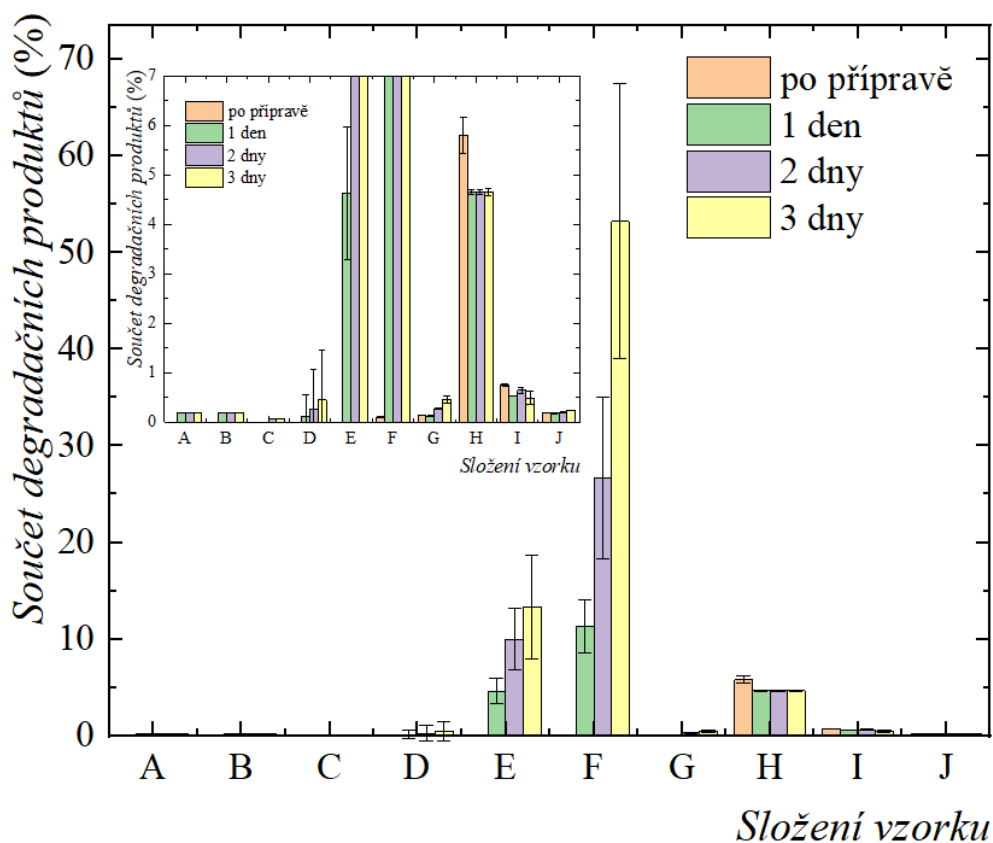
3.3.1 Nárůst obsahu degradačních produktů v čase

Na Obr. 3.7 lze vidět nárůst obsahu degradačních produktů v čase při teplotě 50 °C. U většiny vzorků lze pozorovat po třech dnech největší obsah degradačních produktů. V kontrolních vzorcích A, B, C ani v přítomnosti kyselého (vzorek I) či zásaditého prostředí (vzorek J) k výrazné degradaci nedocházelo. V přítomnosti 3% H₂O₂ v neutrálním prostředí (vzorky D, E, F) docházelo k degradaci v rozsahu 0,1 - 53,2 %. Z Obr. 3.7 je patrné, že vyšší obsah vody v rozpouštědle vzorku vedl k vyššímu obsahu degradačních produktů (vzorky D, E, F). Vyšší obsah vody tedy vede k rychlejší degradaci. Dále lze vidět, že v přítomnosti methanolu (vzorek D) docházelo k výrazně menší degradaci než ve vzorku s acetonitrilem (vzorek E) při stejném objemovém zastoupení vody a organického modifikátoru. Přítomnost kyseliny sírové oxidaci potlačila (vzorek G). V přítomnosti 0,1M NaOH a 3% H₂O₂ (vzorek H) docházelo ke vzniku degradačních produktů již po přípravě vzorku a jejich obsah se v průběhu testování významně neměnil.

Ve stabilitní studii, která je popsána v odstavci 1.6 (Emam a Abdelwahab [31]) docházelo ke vzniku jednoho degradačního produktu, a to v prostředí s MetOH v přítomnosti 3% H₂O₂ (80:20 %, v/v) při 70 °C po dobu dvou hodin bez přístupu světla. Po vyhodnocení hmotnostních spekter měl degradační produkt hodnotu *m/z* 458,4 a odpovídal vzniku karboxylové kyseliny z primárního alkoholu na molekule canagliflozinu. Ve vzorku D (MetOH:H₂O, 50:50 %, v/v + 3% H₂O₂) byl taktéž pozorován jeden degradační produkt s relativním retenčním časem 0,62 a obsahem 0,122 %, který se objevil až při ponechání vzorku při teplotě 50 °C po dobu 1 dne. Stejný degradační produkt byl pozorován ve vzorku při ponechání v zátěžových podmínkách po dobu 2 (obsah degradačního produktu byl 0,26 %) a 3 dní (obsah degradačního produktu: 0,45 %). Degradační produkt se stejným relativním retenčním časem byl nalezen i ve

vzorku F (ACN:H₂O, 30:70 %, v/v + 3% H₂O₂), který byl podroben MS analýze.

Výše uvedená studie dále popisuje, že při vystavení 0,1M HCl a 0,1M NaOH po dobu 2 hodin byl vzorek stabilní. To odpovídá výsledkům z experimentů, které byly provedeny v rámci této studie, neboť obsah vzniklých degradačních produktů ve vzorku ACN:H₂O, 30:70 % v/v + 0,1M HCl (vzorek L) a ve vzorku ACN:H₂O, 30:70 % v/v + 0,1M NaOH (vzorek I) měřených ihned po přípravě vzorku (po 4 hodinách) při teplotě 20 °C byl menší než 0,05 %. Vzorky I a J byly tedy stabilní po dobu 4 hodin.



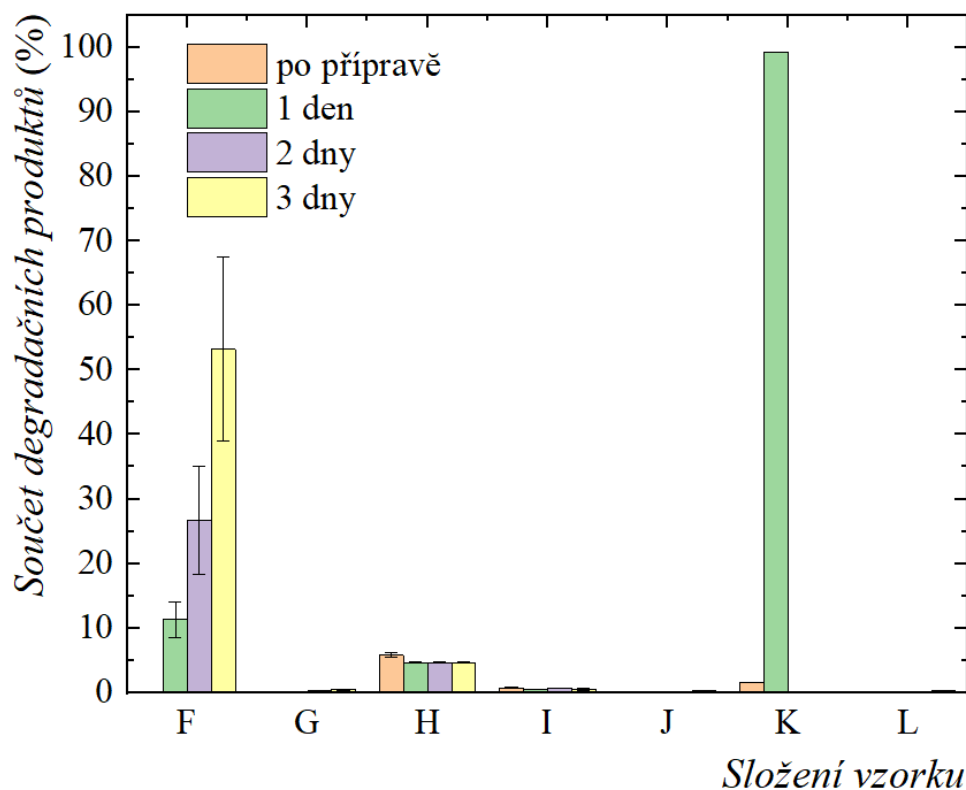
Obr. 3.7: Nárůst obsahu degradačních produktů ve vzorku API canagliflozinu o koncentraci 0,5 mg ml⁻¹ v čase při různém složení vzorku. Vzorek A: ACN:H₂O, 50:50 % v/v; vzorek B: ACN:H₂O, 30:70 %, v/v; vzorek C: MetOH:H₂O, 50:50 %, v/v; vzorek D: MetOH:H₂O, 50:50 %, v/v + 3% H₂O₂; vzorek E: ACN:H₂O, 50:50 %, v/v + 3% H₂O₂; vzorek F: ACN:H₂O, 30:70 %, v/v + 3% H₂O₂; vzorek G: ACN:H₂O, 30:70 %, v/v + 0,1M H₂SO₄ + 3% H₂O₂; vzorek H: ACN:H₂O, 30:70 %, v/v + 0,1M NaOH + 3% H₂O₂; vzorek I: ACN:H₂O, 30:70 %, v/v + 0,1M H₂SO₄; vzorek J: ACN:H₂O, 30:70 %, v/v + 0,1M NaOH. Obsah vody a methanolu v rozpouštědle vzorku hraje důležitou roli v rychlosti degradace.

3.3.2 Vliv kyselého a zásaditého prostředí v rozpouštědle vzorku

Pro posouzení vlivu kyselého prostředí na rychlost degradace byly testovány dvě různé kyseliny, a to 0,1M HCl a 0,1M H₂SO₄. Zásadité prostředí bylo testováno vystavením vzorku canagliflozinu 0,1M NaOH. Na Obr. 3.8 lze vidět, že v přítomnosti 0,1M HCl a 3% H₂O₂ (vzorek K) došlo k výraznému nárůstu obsahu degradačních produktů již po jednom dnu, a to v rozsahu 99,2 %. Po vyhodnocení hmotnostních spekter (viz odstavec 3.4) bylo zjištěno, že v takovémto prostředí došlo ke chloraci molekuly canagliflozinu a tedy ke vzniku nežádoucího oxidačního produktu. V prostředí s H₂SO₄ a s oxidačním činidlem došlo k potlačení degradace, jak je patrné z Obr. 3.8 (vzorek G). V prostředí bez oxidačního činidla docházelo k výraznější degradaci v přítomnosti H₂SO₄. Obě kyseliny byly přítomny ve vzorku ve stejné koncentraci a tím, že H₂SO₄ je dvojsytná, bylo ve vzorku s touto kyselinou nižší pH a degradace probíhala rychleji.

V přítomnosti 0,1M NaOH s oxidačním činidlem (vzorek H) docházelo ke vzniku degradačních produktů ihned po přípravě vzorku a jejich obsah se významně neměnil po dobu tří dnů, jak je patrné z Obr. 3.8. Ve vzorku API s 0,1M NaOH bez oxidačního činidla (vzorek J) nedochází k nárůstu obsahu degradačních produktů, tudíž degradační produkty nevznikly v důsledku znečištění použitého hydroxidu. Degradační produkty vznikající ve vzorku H mohou být oxidačními produkty API, nebo degradační produkty určité nečistoty přítomné v hydroxidu po reakci s oxidačním činidlem.

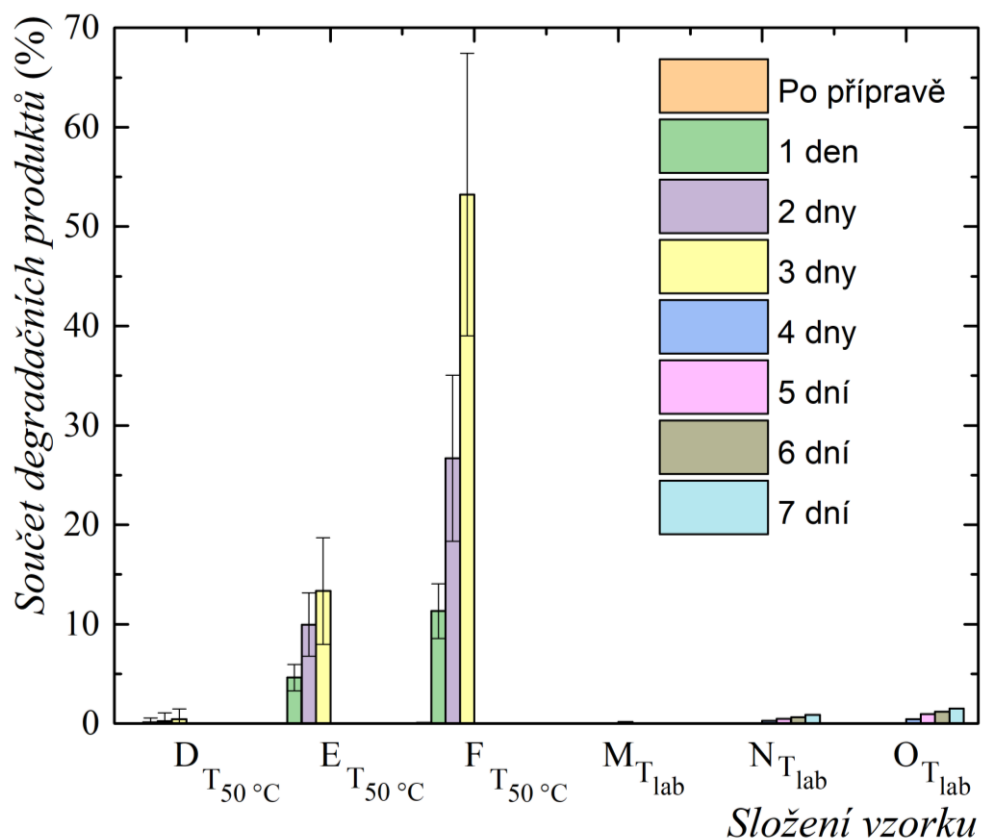
Vzorky I a J ukazují citlivost canagliflozinu na kyselé a zásadité prostředí. Výraznější degradace probíhala v přítomnosti H₂SO₄ či HCl než v NaOH. Canagliflozin tedy ochotněji podléhá degradaci v kyselém prostředí.



Obr. 3.8: Porovnání vlivu kyselého a zásaditého prostředí v rozpouštědle vzorku na rychlost degradace. Vzorek F: ACN:H₂O, 30:70 %, v/v + 3% H₂O₂; vzorek G: ACN:H₂O, 30:70 %, v/v + 0,1M H₂SO₄ + 3% H₂O₂; vzorek H: ACN:H₂O, 30:70 %, v/v + 0,1M NaOH + 3% H₂O₂; vzorek I: ACN:H₂O, 30:70 %, v/v + 0,1M H₂SO₄; vzorek J: ACN:H₂O, 30:70 %, v/v + 0,1M NaOH. vzorek K: ACN:H₂O, 30:70 %, v/v + 0,1M HCl + 3% H₂O₂; vzorek L: ACN:H₂O, 30:70 %, v/v + 0,1M HCl. V přítomnosti H₂SO₄ s oxidačním činidlem došlo k potlačení degradace, naopak v prostředí s HCl s oxidačním činidlem došlo k výraznému nárůstu obsahu degradačních produktů. V prostředí bez oxidačního činidla docházelo k rychlejší degradaci v prostředí s 0,1M H₂SO₄. V zásaditém prostředí spolu s oxidačním činidlem docházelo ke vzniku degradačních produktů ihned po přípravě vzorku a jejich obsah se významně neměnil. Bez oxidačního činidla degradace probíhala rychleji v kyselém prostředí.

3.3.3 Degradace za laboratorní teploty

Během testování oxidativního stresu při laboratorní teplotě byla pozorována výrazně pomalejší degradace, a to v rozsahu 0,2 - 1,5 % během 7 dnů (viz Obr. 3.9). Větší množství degradačních produktů vznikalo ve vzorku s vyšším obsahem vody a v roztocích methanolu vznikalo menší množství degradačních produktů než v roztocích acetonitrilu, stejně jako v případě degradace při 50 °C. Relativní retenční časy vzniklých degradačních produktů odpovídaly relativním retenčním časům degradačních produktů, které vznikaly při 50 °C. Tím se vyloučila možnost vzniku hydroxylových radikálů a tím i odlišných degradačních produktů za zvýšené teploty, jak je popsáno v odstavci 1.3.1.2.



Obr. 3.9: Porovnání rychlosti degradace vzorků při teplotě 50 °C a při laboratorní teplotě. Vzorek D: T = 50 °C, MetOH:H₂O, 50:50, %, v/v + 3% H₂O₂; Vzorek E: T = 50 °C, ACN:H₂O, 50:50 %, v/v + 3% H₂O₂; Vzorek F: T = 50 °C, ACN:H₂O, 30:70 %, v/v + 3% H₂O₂; Vzorek M: T_{lab}, MetOH:H₂O, 50:50, %, v/v + 3% H₂O₂; vzorek N: T_{lab}, ACN:H₂O, 50:50 %, v/v + 3% H₂O₂; vzorek O: T_{lab}, ACN:H₂O, 30:70 %, v/v + 3% H₂O₂. Při laboratorní teplotě probíhala výrazně pomalejší degradace a vznikaly stejné degradační produkty jako za zvýšené teploty. Větší množství degradačních produktů vznikalo ve vzorcích s vyšším obsahem vody a nižší množství degradačních produktů vznikalo ve vzorcích s methanolem, stejně jako v případě degradace při 50 °C.

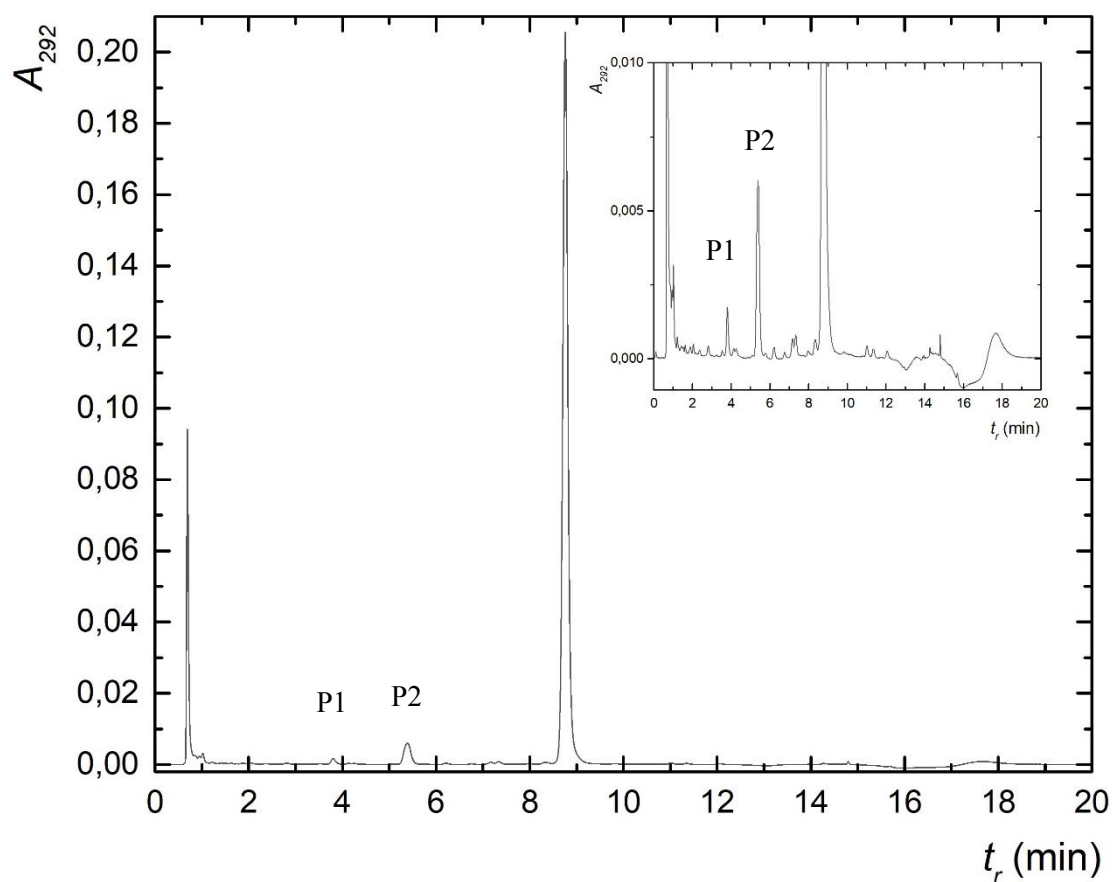
3.4 Studium degradačních produktů pomocí MS

Pro studium hlavních degradačních produktů byly analyzovány vzorky s vyšším obsahem vody – vzorek F (koncentrace canagliflozinu byla $0,5 \text{ mg ml}^{-1}$, ACN:H₂O, 30:70 %, v/v + 3% H₂O₂) a vzorek K (koncentrace canagliflozinu byla $0,5 \text{ mg ml}^{-1}$, ACN:H₂O, 30:70 %, v/v + 0,1M HCl + 3% H₂O₂). Na Obr. 3.10 lze vidět chromatogram vzorku F získaný z UHPLC Infinity 1290, ve kterém lze vidět dva hlavní degradační produkty označené P1 a P2. Oba degradační produkty jsou dostatečně separovány od sebe navzájem a od hlavního píku API optimalizovanou separační metodou. Na Obr. 3.11 lze vidět chromatogram vzorku K. U píku API lze v tomto chromatogramu pozorovat nízkou hodnotu absorbance, neboť se účinná látka téměř zcela rozložila na vzniklé degradační produkty. V 11. minutě eluoval pík, který odpovídal hlavnímu degradačnímu produktu.

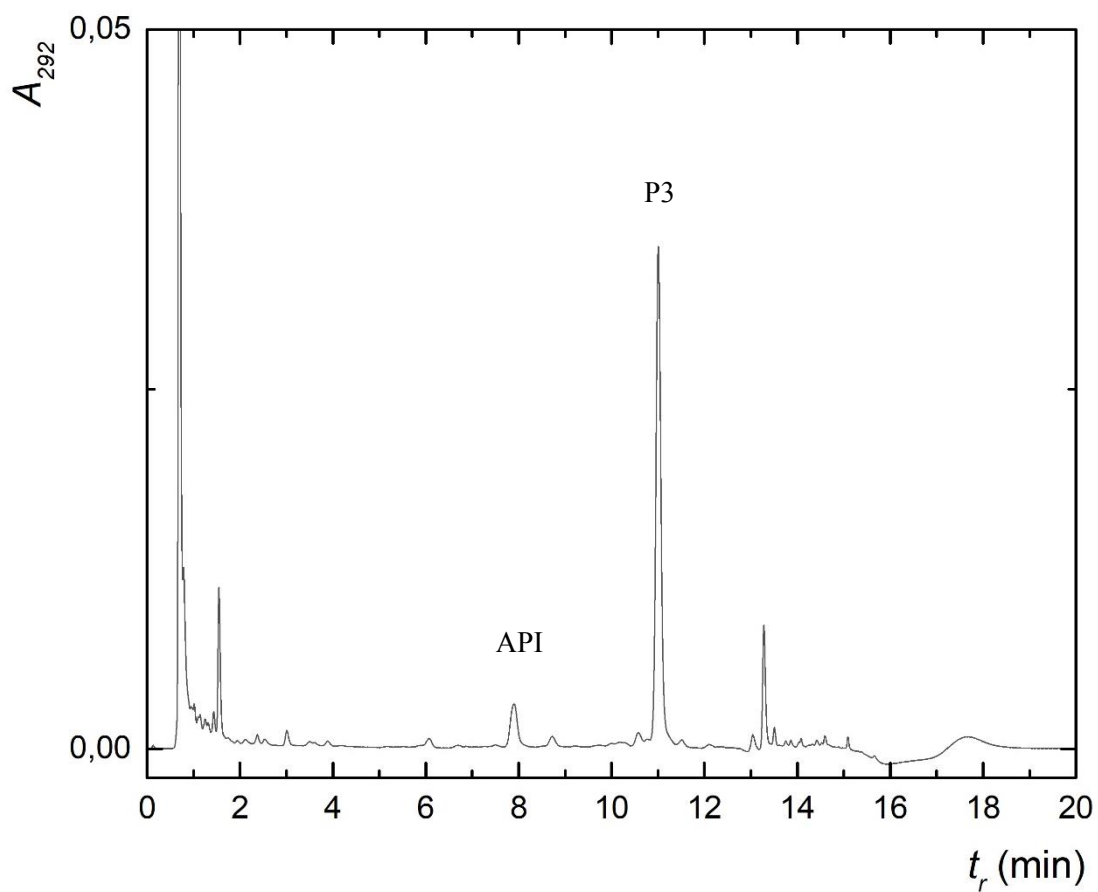
Na Obr. 3.12 lze vidět hmotnostní spektrum API canagliflozinu v negativním módu. Jednotlivé píky v histogramu odpovídají aduktům API s ionty kyseliny mravenčí a mravenčanem amonným, které byly přítomny v mobilní fázi. Stejně adukty lze pozorovat v hmotnostním spektru v negativním módu degradačního produktu P1 ve vzorku F (Obr. 3.13), avšak hodnoty m/z zde byly posunuty o hmotu 32 oproti referenčnímu vzorku canagliflozinu. Na Obr. 3.14 lze vidět hmotnostní spektrum API canagliflozinu v pozitivním módu. Jednotlivé píky v histogramu odpovídají aduktům API s draselnými a amonnými ionty. Stejně adukty lze pozorovat v hmotnostním spektru (Obr. 3.15) degradačního produktu P1 ve vzorku F, avšak opět posunuty o hmotu 32 oproti referenčnímu vzorku canagliflozinu. Hmotu 32 odpovídala dvěma atomům kyslíku, které se navázaly na molekulu canagliflozinu během oxidace. Z hmotnostních spekter (viz Obr. 3.13 a Obr. 3.15) je patrné, že vzniklý degradační produkt s dvěma atomy kyslíku neodpovídá degradačnímu produktu, který je popsán v článku v odstavci 1.6 (Emam a Abdelwahab [31]). Důvodem neshody mohou být odlišné experimentální podmínky (složení rozpouštědla vzorku, rozdílná teplota apod.)

Na Obr. 3.16 a Obr. 3.17 jsou ukázána hmotnostní spektra vzorku K v negativním a pozitivním módu. Jednotlivé píky v histogramu odpovídají stejným aduktům jako u vzorku F, avšak v tomto případě byly píky posunuty o hmotu 35 oproti referenčnímu vzorku canagliflozinu. Hmotu 35 odpovídala atomu chloru, který se navázal na molekulu canagliflozinu během oxidace. Ze spektra je patrné, že poměr intenzity signálů o m/z 496

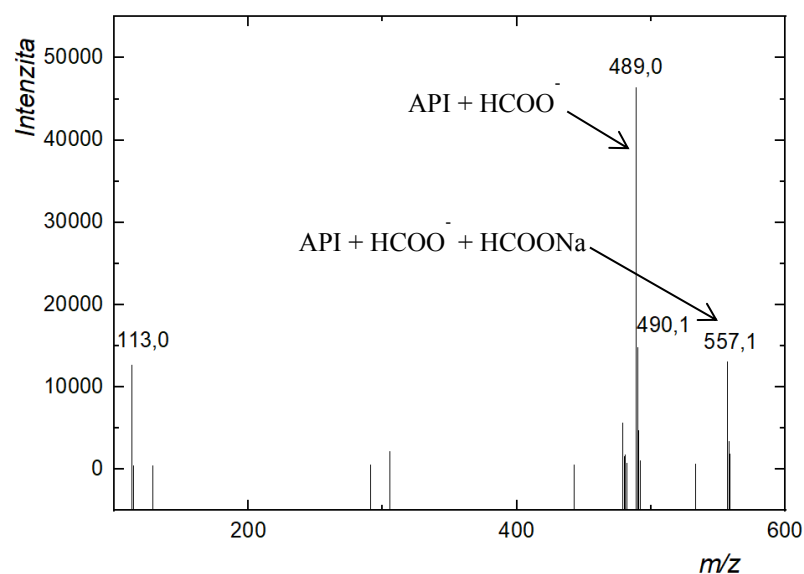
a 498 a signálů o m/z 517 a 519 odpovídá přírodnímu zastoupení izotopů chloru ^{35}Cl a ^{37}Cl , který je 3:1.



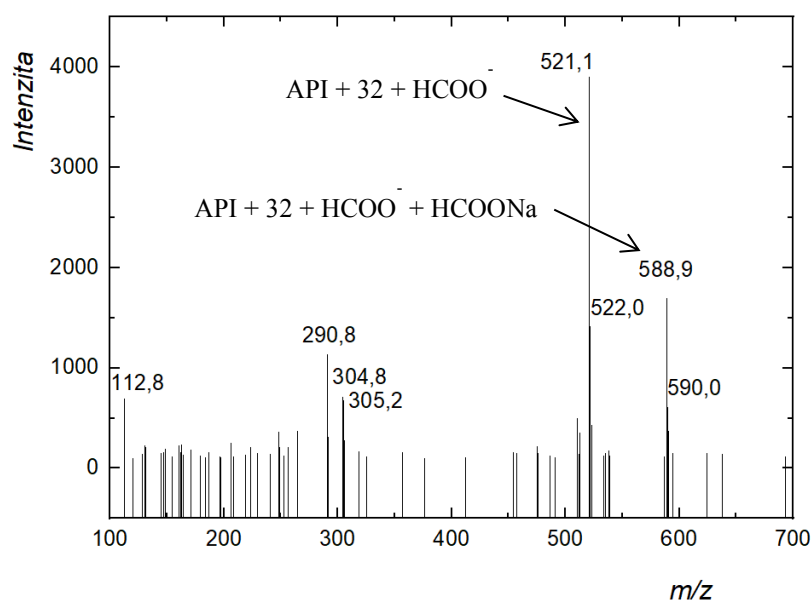
Obr. 3.10: Chromatogram vzorku F (koncentrace API - $0,5 \text{ mg ml}^{-1}$, ACN:H₂O, 30:70 %, v/v + 3% H₂O₂, T = 50 °C, 1 den).



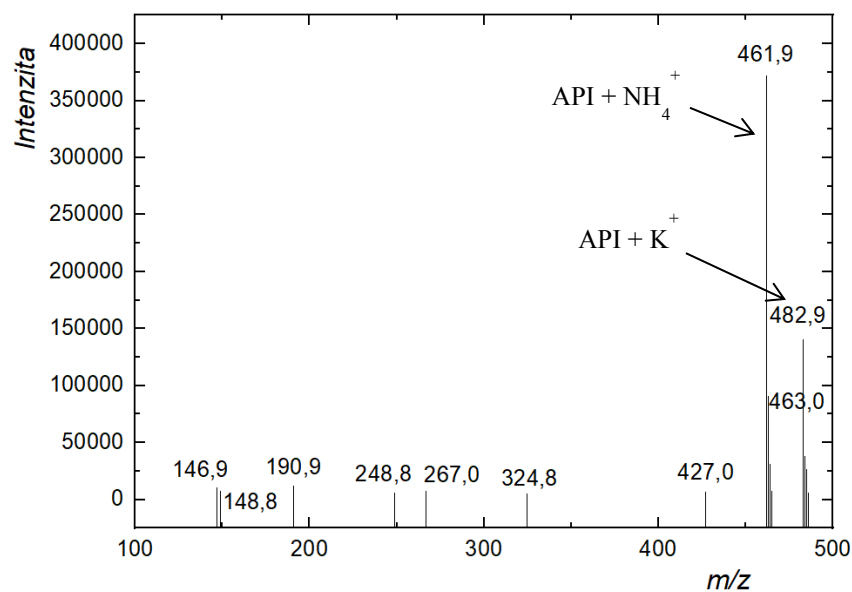
Obr. 3.11: Chromatogram vzorku K (koncentrace API: $0,5 \text{ mg ml}^{-1}$, ACN:H₂O, 30:70 %, v/v + 0,1M HCl + 3% H₂O₂, T = 50 °C, 1 den). Pík API byl z velké části rozštěpen na vzniklé degradační produkty.



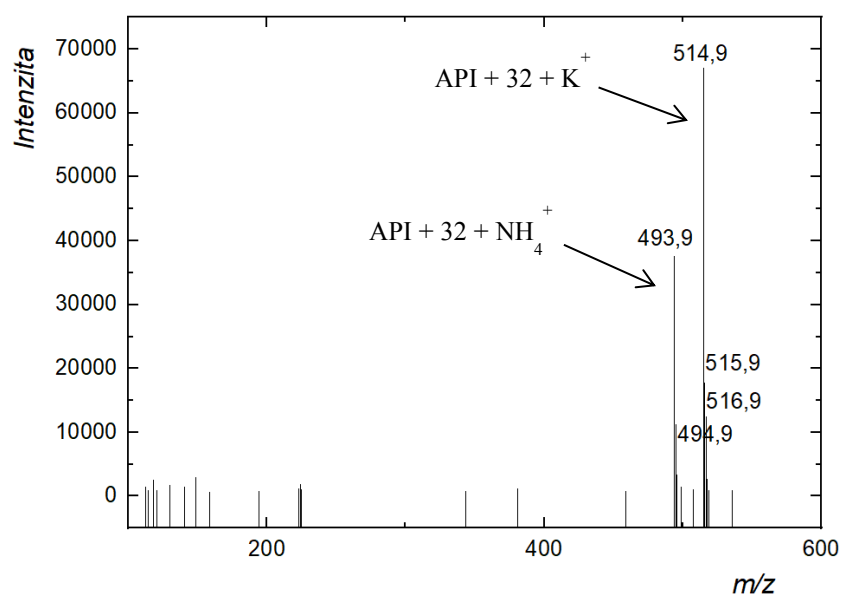
Obr. 3.12: Hmotnostní spektrum v negativním módu píku API canagliflozinu z Obr. 3.10. Na obrázku lze vidět molekulové adukty s mravenčanovým iontem a mravenčanem sodným, které se nacházely v mobilní fázi.



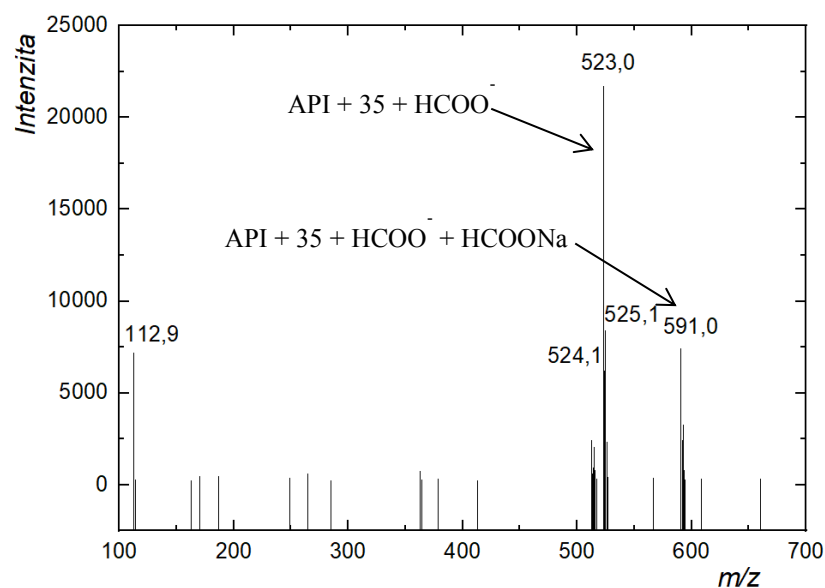
Obr. 3.13: Hmotnostní spektrum v negativním módu degradačního produktu P1 z Obr. 3.10. Na obrázku lze vidět molekulové adukty s mravenčanovým iontem a mravenčanem sodným, které se nacházely v mobilní fázi. Hodnoty m/z jsou posunuty o hmotu 32 oproti referenčnímu vzorku canagliflozinu. Tato hmotu odpovídá 2 atomům kyslíku, které se navázaly na molekulu canagliflozinu během oxidativního stresu.



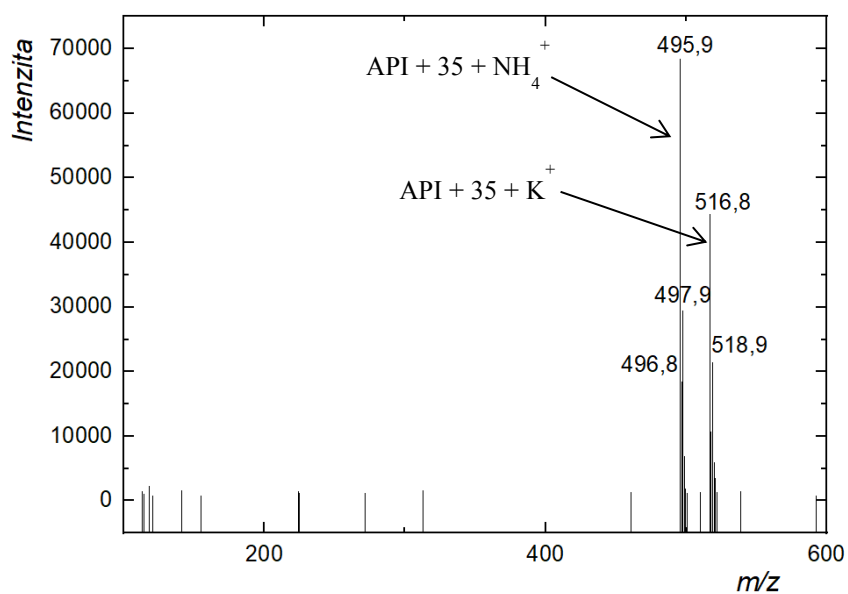
Obr. 3.14: Hmotnostní spektrum v pozitivním módu píku API canagliflozinu z Obr. 3.10. Na obrázku lze vidět molekulové adukty s draselným a amonným iontem, které se nacházely v mobilní fázi.



Obr. 3.15: Hmotnostní spektrum v pozitivním módu píku P1 z Obr. 3.10. Na obrázku lze vidět molekulové adukty s draselným a amonným iontem, které se nacházely v mobilní fázi. Hodnoty m/z jsou posunuty o hmotu 32 oproti referenčnímu vzorku canagliflozinu. Tato hmotnost odpovídá 2 atomům kyslíku, které se navázaly na molekulu canagliflozinu během oxidačního stresu.



Obr. 3.16: Hmotnostní spektrum v negativním módu degradačního produktu P3 z Obr. 3.11. V hmotnostním spektru lze vidět molekulové adukty s mravenčanovým iontem a mravenčanem sodným, které byly posunuty o hmotu 35 oproti referenčnímu vzorku canagliflozinu, což odpovídá chlorované molekule canagliflozinu.



Obr. 3.17: Hmotnostní spektrum v pozitivním módu degradačního produktu P3 z Obr. 3.11. V hmotnostním spektru lze vidět molekulové adukty s draselným a amonným iontem, které byly posunuty o hmotu 35 oproti referenčnímu vzorku canagliflozinu, což odpovídá chlorované molekule canagliflozinu.

4 ZÁVĚR

V této práci byla vyvinuta metoda pro stanovení canagliflozinu pomocí HPLC s UV a MS detekcí. Tato metoda byla dále využita pro zátěžové testování stability canagliflozinu. Optimální chromatografické podmínky, poskytující nejlepší rozlišení degradačních produktů od hlavního píku byly při použití separačního systému s reverzními fázemi, kolona Agilent Poroshell 120 SB-Aq ($2,1 \times 100$ mm, $2,7 \mu\text{m}$), mobilní fáze směs pufru (10mM HCOOH upravená pomocí NH_4OH na hodnotu $\text{pH } 3,5$) a ACN, čerpána gradientovou elucí (čas, min/obsah org. složky, %): 0/30, 1/30, 10/40, 12/80, 13/80, 14/30, 20/30, dávkování $1 \mu\text{l}$, teplota kolony 30°C , teplota autosamploru 15°C , vlnová délka detekce 292 nm a průtok mobilní fáze $0,4 \text{ ml min}^{-1}$. Během validace metody byla zjištěna přesnost měření, opakovatelnost, mez detekce a kvantifikace, linearita a lineární dynamický rozsah, robustnost metody a stabilita vzorku. Hodnota meze detekce metody byla $8,9 \cdot 10^{-5} \text{ mg ml}^{-1}$ ($2,0 \cdot 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$) a hodnota meze kvantifikace byla $3,0 \cdot 10^{-4} \text{ mg ml}^{-1}$ ($6,8 \cdot 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$). Pro koncentraci $0,3 \text{ mg ml}^{-1}$ byla opakovatelnost retenčního času $0,17 \%$ a plochy píku $0,75 \%$. Pro koncentraci $5 \cdot 10^{-3} \text{ mg ml}^{-1}$ byla opakovatelnost retenčního času $0,18 \%$ a plochy píku $1,58 \%$. Koeficient linearity kalibrační závislosti odpovídal hodnotě $0,9517$, koeficient determinace byl $0,9997$ a lineární dynamický rozsah metody byl $3,0 \cdot 10^{-4} - 0,5 \text{ mg ml}^{-1}$. Vyvinutá metoda je robustní vůči mírným odchylkám teploty, obsahu organické složky v mobilní fázi a pH . Optimalizovaná metoda byla použita k zátěžovému testování stability canagliflozinu. Na základě výsledků bylo zjištěno, že na rychlost degradace má vliv obsah vody, typ organického modifikátoru a dále kyselost prostředí. Vzniklé degradační produkty byly dále zkoumány pomocí MS. Vlivem oxidativního stresu došlo k navázání dvou atomů kyslíku na molekulu canagliflozinu. V přítomnosti kyseliny chlorovodíkové byla molekula canagliflozinu obohacena o atom chloru a došlo tak ke vzniku nežádoucího oxidačního produktu. Degradace za laboratorní teploty probíhala výrazně pomaleji než při 50°C a vznikaly při ní stejné degradační produkty jako při experimentech za zvýšené teploty. Stejně jako během testování při 50°C , vyšší množství degradačních produktů vznikalo v prostředí s vyšším obsahem vody, a naopak nižší množství degradačních produktů se nacházelo v prostředí s methanolem. Výsledky získané v této práci budou použity pro porovnání rychlostí chemické a elektrochemické oxidace canagliflozinu.

5 POUŽITÁ LITERATURA

- [1] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Canagliflozin#section=Melting-Point>, převzato 26. 12. 2019.
- [2] <https://www.drugbank.ca/salts/DBSALT001783>, převzato 12. 1. 2020.
- [3] https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/invokana-epar-public-assessment-report_en.pdf, převzato 27. 12. 2019.
- [4] Janssen Pharmaceuticals Inc. Invokana® (canagliflozin) tablets, for oral use: US prescribing information 2013, dostupné z URL: <http://www.janssenmd.com/pdf/invokana/PI-Invokana.pdf>, převzato 27. 12. 2019).
- [5] <https://www.jnj.com/u-s-fda-approves-invokana-canagliflozin-to-treat-diabetic-kidney-disease-dkd-and-reduce-the-risk-of-hospitalization-for-heart-failure-in-patients-with-type-2-diabetes-t2d-and-dkd>, převzato 28. 12. 2019.
- [6] <https://www.drugs.com/pro/invokana.html#s-34067-9>, převzato 28. 12. 2019.
- [7] https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/invokana-epar-product-information_cs.pdf, převzato 27. 12. 2019.
- [8] Baertschi S. W., Alsante K. M., Reed R. A.: Pharmaceutical stress testing, predicting drug degradation, 1-3, 2nd ed. London, Informa Healthcare 2011.
- [9] Státní ústav pro kontrolu léčiv, Požadavky na stabilitní studie v registrační dokumentaci, dostupné z URL: <http://www.sukl.cz/leciva/reg-83>, převzato 31. 12. 2019.
- [10] Baertschi S. W., Alsante K. M., Reed R. A.: Pharmaceutical stress testing, predicting drug degradation, 12, 2nd ed. London, Informa Healthcare 2011.
- [11] International Conference on Harmonization Q1A(R2): Stability Testing of New Drug Substances and Products (Second Revision), 2003.
- [12] Blessy M., Ruchi D. P., Prajesh N. P., Agrawal Y. K., Development of forced degradation and stability indicating studies of drugs – a review, Journal of Pharmaceutical Analysis, Vol. 4 (3), 159-165, 2013.
- [13] Baertschi S. W., Alsante K. M., Reed R. A.: Pharmaceutical stress testing, predicting drug degradation, 21, 2nd ed. London, Informa Healthcare 2011.
- [14] Baertschi S. W., Alsante K. M., Reed R. A.: Pharmaceutical stress testing, predicting drug degradation, 23, 2nd ed. London, Informa Healthcare 2011.

- [15] Laus G.: Kinetics of acetonitrile-assisted oxidation of tertiary amines by hydrogen peroxide, *Journal of The Chemical Society, Perkin Transaction 2*, 864–868, 2001.
- [16] Baertschi S. W., Alsante K. M., Reed R. A.: *Pharmaceutical stress testing, predicting drug degradation*, 23-26, 2nd ed. London, Informa Healthcare 2011.
- [17] Hovorka S. W., Schöneich CH.: Oxidative degradation of pharmaceuticals: theory, mechanisms and inhibition, *Journal of Pharmaceutical Science*, Vol. 90, Issue 3, 253-269, 2001.
- [18] Wasylaschuk W. R., Harmon P. A., Wagner G.: Evaluation of hydroperoxides in common pharmaceutical excipients, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, Vol. 96, Issue 1, 106–116, 2007.
- [19] Baertschi S. W., Alsante K. M., Reed R. A.: *Pharmaceutical stress testing, predicting drug degradation*, 42, 2nd ed. London, Informa Healthcare 2011.
- [20] Baertschi S. W., Alsante K. M., Reed R. A.: *Pharmaceutical stress testing, predicting drug degradation*, 16-17, 2nd ed. London, Informa Healthcare 2011.
- [21] Baertschi S. W., Alsante K. M., Reed R. A.: *Pharmaceutical stress testing, predicting drug degradation*, 40, 2nd ed. London, Informa Healthcare 2011.
- [22] Baertschi S. W., Alsante K. M., Reed R. A.: *Pharmaceutical stress testing, predicting drug degradation*, 27-28, 2nd ed. London, Informa Healthcare 2011.
- [23] ICH quality guidelines, Q1B Photostability testing of new active substances and medicinal products, dostupné z URL: <https://www.ich.org/page/quality-guidelines>, převzato 29. 12. 2019.
- [24] Skoog D. A., West D. M., Holler F. J., Crouch S. R., *Analytická chemie (z angl. Fundamental of analytical chemistry)*, 844, czech edition, Praha, VŠCHT, 2019.
- [25] Skoog D. A., West D. M., Holler F. J., Crouch S. R., *Analytická chemie (z angl. Fundamental of analytical chemistry)*, 748-749, czech edition, Praha, VŠCHT, 2019.
- [26] Skoog D. A., West D. M., Holler F. J., Crouch S. R., *Analytická chemie (z angl. Fundamental of analytical chemistry)*, 841, czech edition, Praha, VŠCHT, 2019.
- [27] Skoog D. A., West D. M., Holler F. J., Crouch S. R., *Analytická chemie (z angl. Fundamental of analytical chemistry)*, 747 – 748, czech edition, Praha, VŠCHT, 2019.
- [28] Iqbal M., Ezzeldin E., Al-Rashood K. A., Asiri Y. A., Rezk N. L.: Rapid determination of canagliflozin in rat plasma by UHPLC-MS/MS using negative ionization mode to avoid adduct-ions formation, *Talanta*, Vol. 132, 29-36, 2015.

- [29] Saibaba S. V., Pilli N. R., Bimireddy B. P. K., Pandiyan P. S.: A novel and rapid LC MS/MS assay method for the determination of canagliflozin in human plasma by solid phase extraction technique and its application to a pharmacokinetic study, *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*, Vol. 4, 131-138, 2018.
- [30] Panigraphy U. P., Reddy S. K.: A Novel Validated RP-HPLC-DAD Method for the Simultaneous Estimation of Metformin Hydrochloride and Canagliflozin in Bulk and Pharmaceutical Tablet Dosage form with Forced Degradation Studies, *Oriental Journal of Chemistry*, Vol. 31(3), 1489-1507, 2015.
- [31] Emam A. A., Abdelwahab N. S.: Stability indicating chromatographic and chemometric methods for environmentally benign determination of canagliflozin and its major degradation product; A comparative study and greenness assessment, *Biomedical Chromatography*, 33:e4612, 2019.
- [32] Gurralla S., Shivaraj, Subrahmanyam C. V. S., Panikumar A. D., Gowthami S.: Analytical Quality by Design Assisted HPLC Method for Quantification of Canagliflozin/ Metformin and Stability Studies, *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*, Vol. 53, 699-709, 2019.
- [33] ICH quality guidelines, Q2 analytical validation, dostupné z URL: <https://www.ich.org/page/quality-guidelines>, převzato 28. 2. 2020.
- [34] Harris D. C.: Quantitative chemical analysis, 54 - 56, 7th ed. New York, Freeman 2007.

6 PŘÍLOHY

Tab. 6.1.: Závislost plochy píků vybraných degradačních produktů s plochou větší než 0,2 % vztažených k součtu ploch všech píků v chromatogramu, vznikající při vystavení API degradačním podmínkám ihned po přípravě vzorku.

Složení vzorku	Součet všech degradačních produktů [%]	Imp RRT							
		0,44 [%]	0,62 [%]	0,75 [%]	1,62 [%]	1,62 [%]	1,68 [%]	1,68 [%]	
ACN:H ₂ O, 30:70	0,00	-	-	-	-	-	-	-	-
ACN:H ₂ O, 50:50	0,00	-	-	-	-	-	-	-	-
MetOH:H ₂ O, 50:50	0,00	-	-	-	-	-	-	-	-
ACN:H ₂ O, 30:70 + 3% H ₂ O ₂ _1	0,11	-	-	-	-	-	-	-	-
ACN:H ₂ O, 30:70 + 3% H ₂ O ₂ _2	0,11	-	-	-	-	-	-	-	-
ACN:H ₂ O, 30:70 + 3% H ₂ O ₂ _3	0,10	-	-	-	-	-	-	-	-
ACN:H ₂ O, 50:50 + 3% H ₂ O ₂ _1	0,00	-	-	-	-	-	-	-	-
ACN:H ₂ O, 50:50 + 3% H ₂ O ₂ _2	0,00	-	-	-	-	-	-	-	-
ACN:H ₂ O, 50:50 + 3% H ₂ O ₂ _3	0,00	-	-	-	-	-	-	-	-
MetOH:H ₂ O, 50:50 + 3% H ₂ O ₂ _1	0,00	-	-	-	-	-	-	-	-
MetOH:H ₂ O, 50:50 + 3% H ₂ O ₂ _2	0,00	-	-	-	-	-	-	-	-
MetOH:H ₂ O, 50:50 + 3% H ₂ O ₂ _3	0,00	-	-	-	-	-	-	-	-
ACN:H ₂ O, 30:70, 0,1M H ₂ SO ₄ + 3% H ₂ O ₂ _1	0,15	-	-	-	-	-	-	-	-
ACN:H ₂ O, 30:70, 0,1M H ₂ SO ₄ + 3% H ₂ O ₂ _2	0,14	-	-	-	-	-	-	-	-
ACN:H ₂ O, 30:70, 0,1M H ₂ SO ₄ + 3% H ₂ O ₂ _3	0,14	-	-	-	-	-	-	-	-
ACN:H ₂ O, 30:70, 0,1M NaOH + 3% H ₂ O ₂ _1	5,31	-	-	-	4,81	-	0,36	-	-
ACN:H ₂ O, 30:70, 0,1M NaOH + 3% H ₂ O ₂ _2	6,04	-	-	-	5,19	-	0,61	-	-
ACN:H ₂ O, 30:70, 0,1M NaOH + 3% H ₂ O ₂ _3	5,80	-	-	-	5,17	-	0,48	-	-
ACN:H ₂ O, 30:70 + 0,1M NaOH_1	0,18	-	-	-	-	-	-	-	-
ACN:H ₂ O, 30:70 + 0,1M NaOH_2	0,19	-	-	-	-	-	-	-	-
ACN:H ₂ O, 30:70 + 0,1M NaOH_3	0,19	-	-	-	-	-	-	-	-
ACN:H ₂ O, 30:70 + 0,1M H ₂ SO ₄ _1	0,78	-	-	0,60	-	-	-	-	-
ACN:H ₂ O, 30:70 + 0,1M H ₂ SO ₄ _2	0,76	-	-	0,58	-	-	-	-	-
ACN:H ₂ O, 30:70 + 0,1M H ₂ SO ₄ _3	0,74	-	-	0,56	-	-	-	-	-
ACN:H ₂ O 30:70 + 3% H ₂ O ₂ _ Lab T_4 dny	0,45	0,33	0,13	-	-	-	-	-	-
ACN:H ₂ O 50:50, + 3% H ₂ O ₂ _ Lab T_4 dny	0,29	0,17	0,12	-	-	-	-	-	-

Tab. 6.2.: Zavislost plochy piků vybraných degradačních produktů s plochou větší než 0,2 % vztažených k součtu ploch všech piků v chromatogramu, vznikající při vystavení API degradačním podmínkám při teplotě 50 °C po 1 dnu.

Složení vzorku	Součet všech degradačních produktů [%]											
	Imp	RRT [%]	Imp	RRT [%]	Imp	RRT [%]	Imp	RRT [%]	Imp	RRT [%]	Imp	RRT [%]
ACN:H ₂ O, 30:70	0,19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ACN:H ₂ O, 50:50	0,19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MetOH:H ₂ O, 50:50	0,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ACN:H ₂ O, 30:70 + 3% H ₂ O ₂ _1	9,49	6,66	1,39	0,27	0,22	0,13	-	-	-	-	-	0,12
ACN:H ₂ O, 30:70 + 3% H ₂ O ₂ _2	11,32	8,08	1,64	0,37	0,25	0,19	-	-	-	-	-	0,13
ACN:H ₂ O, 30:70 + 3% H ₂ O ₂ _3	14,91	10,98	1,76	0,67	0,30	0,20	-	-	-	-	-	0,14
ACN:H ₂ O, 50:50 + 3% H ₂ O ₂ _1	6,54	3,82	1,23	0,18	0,27	0,24	-	-	-	-	-	0,17
ACN:H ₂ O, 50:50 + 3% H ₂ O ₂ _2	4,63	2,26	1,14	0,08	0,23	0,18	-	-	-	-	-	0,16
ACN:H ₂ O, 50:50 + 3% H ₂ O ₂ _3	3,97	1,54	1,14	-	0,17	0,09	-	-	-	-	-	0,78
MetOH:H ₂ O, 50:50 + 3% H ₂ O ₂ _1	0,11	-	0,11	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MetOH:H ₂ O, 50:50 + 3% H ₂ O ₂ _2	0,86	-	0,86	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MetOH:H ₂ O, 50:50 + 3% H ₂ O ₂ _3	0,12	-	0,12	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ACN:H ₂ O, 30:70, 0,1M H ₂ SO ₄ + 3% H ₂ O ₂ _1	0,14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ACN:H ₂ O, 30:70, 0,1M H ₂ SO ₄ + 3% H ₂ O ₂ _2	0,13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ACN:H ₂ O, 30:70, 0,1M H ₂ SO ₄ + 3% H ₂ O ₂ _3	0,13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ACN:H ₂ O, 30:70, 0,1M NaOH + 3% H ₂ O ₂ _1	4,57	-	-	-	-	-	-	-	4,08	0,25	-	-
ACN:H ₂ O, 30:70, 0,1M NaOH + 3% H ₂ O ₂ _2	4,68	-	-	-	-	-	-	-	4,06	0,38	-	-
ACN:H ₂ O, 30:70, 0,1M NaOH + 3% H ₂ O ₂ _3	4,65	-	-	-	-	-	-	-	4,09	0,36	-	-
ACN:H ₂ O, 30:70 + 0,1M NaOH_1	0,19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ACN:H ₂ O, 30:70 + 0,1M NaOH_2	0,20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ACN:H ₂ O, 30:70 + 0,1M NaOH_3	0,17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ACN:H ₂ O, 30:70 + 0,1M H ₂ SO ₄ _1	0,55	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ACN:H ₂ O, 30:70 + 0,1M H ₂ SO ₄ _2	0,54	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ACN:H ₂ O, 30:70 + 0,1M H ₂ SO ₄ _3	0,54	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ACN:H ₂ O 30:70 + 3% H ₂ O ₂ _ Lab T_5 dní	0,95	0,39	0,40	-	0,05	-	-	-	-	-	-	-
ACN:H ₂ O 50:50, + 3% H ₂ O ₂ _ Lab T_5 dní	0,49	0,21	0,28	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tab. 6.3: Závislost plochy píků vybraných degradačních produktů s plochou větší než 0,5 % vztažených k součtu ploch všech píků v chromatogramu, vznikající při vystavení API degradačním podmínkám při teplotě 50 °C po 2 dnech.

Složení vzorku	Součet všech degradačních produktů [%]	Imp RRT 0,19 [%]	Imp RRT 0,27 [%]	Imp RRT 0,44 [%]	Imp RRT 0,63 [%]	Imp RRT 0,66 [%]	Imp RRT 0,72 [%]	Imp RRT 1,62 [%]
ACN:H ₂ O, 30:70	0,19	-	-	-	-	-	-	-
ACN:H ₂ O, 50:50	0,19	-	-	-	-	-	-	-
MetOH:H ₂ O, 50:50	0,07	-	-	-	-	-	-	-
ACN:H ₂ O, 30:70 + 3% H ₂ O ₂ _1	24,99	0,36	0,52	17,30	2,64	1,50	0,29	0,26
ACN:H ₂ O, 30:70 + 3% H ₂ O ₂ _2	26,70	0,39	0,52	18,68	2,59	1,97	0,38	0,28
ACN:H ₂ O, 30:70 + 3% H ₂ O ₂ _3	40,27	0,69	0,92	29,25	2,56	3,85	0,62	0,29
ACN:H ₂ O, 50:50 + 3% H ₂ O ₂ _1	13,60	0,11	0,23	7,53	1,90	0,66	0,18	0,24
ACN:H ₂ O, 50:50 + 3% H ₂ O ₂ _2	9,97	0,07	0,15	4,13	1,97	0,24	0,21	0,16
ACN:H ₂ O, 50:50 + 3% H ₂ O ₂ _3	7,26	0,00	0,09	2,89	2,25	0,13	0,15	0,05
MetOH:H ₂ O, 50:50 + 3% H ₂ O ₂ _1	0,23	-	-	-	-	-	-	-
MetOH:H ₂ O, 50:50 + 3% H ₂ O ₂ _2	1,66	-	-	-	-	-	-	-
MetOH:H ₂ O, 50:50 + 3% H ₂ O ₂ _3	0,26	-	-	-	-	-	-	-
ACN:H ₂ O, 30:70, 0,1M H ₂ SO ₄ + 3% H ₂ O ₂ _1	0,27	-	-	-	-	-	-	-
ACN:H ₂ O, 30:70, 0,1M H ₂ SO ₄ + 3% H ₂ O ₂ _2	0,29	-	-	-	-	-	-	-
ACN:H ₂ O, 30:70, 0,1M H ₂ SO ₄ + 3% H ₂ O ₂ _3	0,28	-	-	-	-	-	-	-
ACN:H ₂ O, 30:70, 0,1M NaOH + 3% H ₂ O ₂ _1	4,54	-	-	-	-	-	-	4,06
ACN:H ₂ O, 30:70, 0,1M NaOH + 3% H ₂ O ₂ _2	4,63	-	-	-	-	-	-	4,05
ACN:H ₂ O, 30:70, 0,1M NaOH + 3% H ₂ O ₂ _3	4,65	-	-	-	-	-	-	4,08
ACN:H ₂ O, 30:70 + 0,1M NaOH_1	0,20	-	-	-	-	-	-	-
ACN:H ₂ O, 30:70 + 0,1M NaOH_2	0,21	-	-	-	-	-	-	-
ACN:H ₂ O, 30:70 + 0,1M NaOH_3	0,19	-	-	-	-	-	-	-
ACN:H ₂ O, 30:70 + 0,1M H ₂ SO ₄ _1	0,67	-	-	-	-	-	-	-
ACN:H ₂ O, 30:70 + 0,1M H ₂ SO ₄ _2	0,55	-	-	-	-	-	-	-
ACN:H ₂ O, 30:70 + 0,1M H ₂ SO ₄ _3	0,64	-	-	-	-	-	-	-
ACN:H ₂ O 30:70 + 3% H ₂ O ₂ _ Lab T_6 dní	1,19	-	-	0,45	0,50	-	0,09	-
ACN:H ₂ O 50:50, + 3% H ₂ O ₂ _ Lab T_6 dní	0,65	-	-	0,29	0,35	-	-	-

